Zusammenhang zwischen Chromosomenaberrationen und Koloniebildungsfähigkeit in bestrahlten Säugetierzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der
Universität Zürich

von
Josef Tremp
von Schänis SG

Begutachtet von
Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli
Prof. Dr. R. Nöthiger
Prof. Dr. W. Schmid

Zürich 1979
W. Schneider, Druckerei, Zürich

Zusammenhang zwischen Chromosomenaberrationen und Koloniebildungsfähigkeit in bestrahlten Säugetierzellen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde
vorgelegt der
Philosophischen Fakultät II
der
Universität Zürich

von
Josef Tremp
von Schänis SG

Begutachtet von
Prof. Dr. Hedi Fritz-Niggli
Prof. Dr. R. Nöthiger
Prof. Dr. W. Schmid

Zürich 1979
W. Schneider, Druckerei, Zürich

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Frau Prof. Dr. H. Fritz-Niggli danke ich für die Ueberlassung des interessanten Themas, für ihre Unterstützung und ihr Interesse an dieser Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. R. Nöthiger und Herrn Prof. Dr. W. Schmid für die sorgfältige Durchsicht und Begutachtung des Manuskripts. Auch danke ich den Herren Dr. L. Molinari und A. Buja für die ausgezeichnete statistische Beratung und Hilfe, W. Burkard und Dr. P. Schweizer für zahlreiche Diskussionen und wertvolle Anregungen, Dr. G. Mindek für die Ueberlassung der Zellinie und für die Einführung in die Methoden der Zellkultur sowie Frau D. Bohrer für die fleissigen Arbeiten im Labor.

Frau Prof. Dr. H. Fritz-Niggli danke ich für die Ueberlassung des interessanten Themas, für ihre Unterstützung und ihr Interesse an dieser Arbeit. Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. W. [illegible] und Herrn Prof. Dr. W. [illegible] für die wertvollen Ratschläge und Beurteilung des Manuskriptes. Mein Dank gilt den Herren Dr. L. [illegible] und A. [illegible] für die [illegible] Beratung und Hilfe, [illegible] und Dr. W. [illegible] für [illegible] Diskussionen und wertvolle Anregungen, Dr. [illegible] für die [illegible] der [illegible] und für die [illegible] der Aufnahmen am [illegible] sowie Frau [illegible] für die [illegible] Arbeiten.

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

Zusammenfassung I

Summary III

1. Einleitung 1

2. Material und Methoden 4

2.1. Zellinie 4

2.2. Zellzyklusdauer 5

2.3. Zellklonierung 5

2.3. Zellsynchronisierung 7

2.5. Experimenteller Ablauf der Zellklonierungsanalyse und der parallel dazu durchgeführten Bestimmung der Chromosomenaberrationen 9

2.6. Bestrahlungsanordnung 11

2.7. Statistik 11

3. Ergebnisse 12

3.1. Koloniegrössen bei unterschiedlicher Strahlendosis: Dosiseffektkurven und Koloniegrössenverteilung 12

3.2. Analyse der mit 3oo rad in der frühen G_1-Phase induzierten Chromosomenaberrationen im Zusammenhang mit der mitotischen Verzögerung 13

3.3. Analyse der Koloniegrösse nach einer konstanten Bestrahlungsdosis der Stammzellen mit 3oo rad in der frühen G_1-Phase 18

3.4. Mikrokerne und Mitosenhäufigkeiten in den einzelnen Zellkolonien 2o

3.5. Makrokoloniebildung und ihre Beziehung zu den Chromosomenaberrationen 23

4. Diskussion 24

4.1. Chromosomenaberrationen und Verzögerung des Zellzyklus 24

4.2. Biologische Interpretation der negativen Binomialverteilung von Chromosomenaberrationen 27

4.3. Zellüberleben 3o
4.4. Die Rolle von Chromosomenaberrationen für den Zelltod 32
Literatur 35
Tabellen 44
Abbildungen 56

ZUSAMMENFASSUNG

Bestrahlte Zellen weisen gegenüber unbestrahlten einerseits vermehrt Chromosomenaberrationen auf, anderseits sind sie vermindert proliferationsfähig oder sie sterben ab. Der Zusammenhang zwischen diesen Effekten der Bestrahlung wurde untersucht.

Zellen von Fibroblasten der geklonten Linie 19/1 des Chinesischen Hamsters wurden in der Mitose synchronisiert und zwei Stunden danach, wenn sie sich in der frühen G_1-Phase befanden, mit 3oo rad Röntgenstrahlen bestrahlt.
Die Rate der Chromosomenaberrationen wurde in jenen Zellen bestimmt, die in die folgende Mitose gelangten. Trotz Synchronisation war der Zeitpunkt des Eintretens von Zellen in die erste Mitose nach der Bestrahlung verschieden, wobei die bestrahlten gegenüber den unbestrahlten Zellen keine signifikante Zellzyklusverzögerung erfuhren. Daher wurde die Aberrationsrate in zwei-Stunden-Intervallen bestimmt (16-28 h nach der Synchronisation).
Zellen mit einer mittleren Zellzykluslänge von 22-24 h wiesen die höchste Rate von Chromosomenaberrationen auf. Die beobachtete Häufigkeitsverteilungen der Aberrationen pro Zelle entsprach einer negativen Binomialverteilung. Ihre biologische Bedeutung, vor allem das aus der Warteschlangen-Theorie (M/M/1) entwickelte Modell, wird diskutiert.
Die Anteile an Zellen ohne Aberrationen nahmen in der Sammlungsperiode bei 16-24 h nach Synchronisation kontinuierlich ab und stiegen anschliessend wieder an (24-28 h).
In parallelen Versuchen wurden die entsprechenden mitotischen Zellen als klonale Stammzellen ausgesät und auf deren Koloniebildung geprüft. Der Anteil an Zellen mit der Fähigkeit zur Bildung von Makrokolonien, d.h. von Kolonien mit mehr als 5o Zellen, nahm mit zunehmender Zellzykluslänge kontinuierlich ab, während der Anteil an Zellen ohne Koloniebildung, d.h. der Zelltod, zunahm. Unabhängig von den verschiedenen Zellzykluslängen bildeten immer gleiche prozentuale Anteile von Zellen Mikroko-

lonien, d.h. Kolonien mit weniger als 5o Zellen.
Die Anteile von Zellen ohne Aberrationen korrelierten mit den Anteilen gebildeter Makrokolonien für die Sammlungszeiten von 16-24 h. Zellen mit einem langen Zellzyklus (24-26 h) bildeten deutlich weniger Makrokolonien als diejenigen mit einer mittleren Zellzyklusdauer (22-24 h), obwohl der Anteil von Zellen ohne Aberrationen gegenüber den vorhergehenden zunahm. Für diese Zellfraktion werden sublichtmikroskopische Defekte genetischer oder zytoplasmatischer Art postuliert, welche möglicherweise neben den Chromosomenaberrationen eine zusätzliche Rolle für die Nicht-Koloniebildung, d.h. den Zelltod, spielen.
Die Anzahl Mikrokerne pro Kolonie war in ähnlichem Umfang bei Makrokolonien, die sowohl aus bestrahlten wie aus unbestrahlten Zellen hervorgingen, vorhanden. Eine Elimination von strahleninduzierten, mikrokerntragenden Zellen durch Zelltod wird diskutiert.
Die aus bestrahlten Zellen hervorgegangenen Makrokolonien wiesen signifikant weniger Mitosen pro Kolonie auf als die aus unbestrahlten Zellen hervorgegangenen Makrokolonien. Es wird auf eine mögliche strahleninduzierte Verlangsamung des Zellzyklus oder auf eine Mosaikbildung in den Zellkolonien für proliferierende und nicht-proliferierende Zellen hingewiesen.

SUMMARY

Compared to untreated controls, irradiated cells show on the one hand more chromosome aberrations and on the other hand a reduced proliferation capacity or are killed. The correlation between these two radiation effects was investigated.
Chinese hamster fibroblast cells of the cloned line 19/1 were synchronized in mitosis and two hours later irradiated with 3oo rad of X-rays during the subsequent early G_1.
The rate of chromosome aberrations was determined in those cells that reached the following mitosis. In spite of synchronization the time to the following mitosis was different from one cell to another, whereby irradiated and unirradiated cells showed no differences. Therefore the rate of aberrations was determined at two-hour intervals (16-28 h after synchronization).
The highest rate of chromosome aberrations occurred in cells with a cell cycle of medium length (22-24 h). The observed distribution of frequency of aberrations per cell was in accordance with a negative binomial distribution. The biological relevance will be discussed in the context of the model from the queuing theory (M/M/1), as developed by other authors.
The frequency of cells without chromosomal aberrations steadily decreased in the collecting period between 16 and 24 h after synchronization, whereas from 24 to 28 h it increased again.

In parallel samples the mitotic cells were plated and their colony-forming ability was examined. The proportion of cells that formed macrocolonies, i.e. colonies with more than 5o cells, decreased with increasing cell cycle length, whereas the number of non-colony-forming cells, i.e. cell death, increased. Irrespective of various cell cycle lengths and different rates of chromosome aberrations, the number of cells forming microcolonies, i.e. colonies with less than 5o cells, remained constant.

In the collecting period from 16 to 24 h, a correlation was found between cells without chromosome aberrations and the ability to form macrocolonies. Cells with a long first cell cycle

(24-26 h) formed markedly less macrocolonies than the ones with medium cell cycle duration (22-24 h), although the proportion of cells without aberrations was higher for the long cell cycle group. Therefore in the case of cells with a long cell cycle a genetic or cytoplasmic damage is postulated which possibly plays, together with chromosome aberrations, a supplementary part in the inability to form colonies, i.e. cell death.

The number of micronuclei per colony was similar in the macrocolonies from irradiated and from unirradiated cells. This is probably due to elimination of cells with radiation induced micronuclei.

The frequency of mitosis was significantly lower in macrocolonies derived from irradiated cells compared to those from macrocolonies of untreated cells. It is possible that irradiation led to a lengthening of the cell cycle or that the colonies were mosaic for dividing and non-dividing cells.

1. EINLEITUNG

Intrazelluläre Energiedeposition durch ionisierende Strahlen ist meistens mit lebensfeindlichen Reaktionen verbunden. Aus einer Vielfalt von Bestrahlungsreaktionen interessieren insbesondere Zellinaktivierung und Zelltod. Inaktivierung bedeutet einen vorübergehenden oder ständigen Verlust der Teilungsfähigkeit, während beim Zelltod ein Zugrundegehen einer Zelle vorliegt. Dabei kann der Effekt sofort nach der Bestrahlung (Interphasentod) oder erst nach einer oder mehreren Generationen (reproduktiver Tod) auftreten. Inaktivierte Zellen und Zelltod haben für medizinische Belange grosse Bedeutung erlangt und während vieler Jahre wurde nach der Ursache und Eigenart dieser zellulären Reaktionen geforscht.
Eine heute vielfach angewandte Methode zum Studium der Strahlenwirkung auf Zellen beruht auf einer indirekten Abschätzung der Todesrate. Dabei werden die bestrahlten Zellen in vitro auf ihre Proliferationsfähigkeit getestet (PUCK und MARCUS, 1956). Als Mass für die Strahlenschädigung wird die Fähigkeit zur Kolonie-Bildung gewählt. Es wird angenommen, dass Zellkolonien, auch Zellklone oder Klone genannt, die aus mehr als 5o Zellen bestehen, von einer vitalen Zelle abstammen, während Mikrokolonien, d.h. weniger als 5o Zellen pro Kolonie, auf eine nicht-koloniebildungsfähige Zelle zurückgeführt werden können. Die Zellen, die keine Makrokolonien bilden, werden "letal" genannt, und für die Darstellung von Ueberlebenskurven (Dosiseffektkurven) werden allgemein nur die makroskopischen Zellkolonien betrachtet.
Als Ursache der Zellinaktivierung wurden letale Mutationen angenommen, und es wurden für verschiedene Dosisbereiche gleiche Schädigungsmechanismen vorausgesetzt. In Wirklichkeit lässt eine Nicht-Koloniebildung folgende Interpretationen bezüglich der bestrahlten Ursprungszelle, d.h. der klonalen Stammzelle, zu (WESTRA und BARENDSEN, 1966; FRITZ-NIGGLI und BLATTMANN, 1969; BLATTMANN, 1974; HAGEMANN, 1976) :

- es tritt Zelltod ein (Interphasentod oder reproduktiver Tod)
- die Zelle hat die Teilungsfähigkeit verloren
- die Zelle hat die Proliferationsfähigkeit nicht verloren, die Anzahl Zellen pro Zellkolonie nimmt jedoch langsamer zu als in unbestrahlten Kolonien.

Koloniebildung beinhaltet ebenfalls die Möglichkeit eines vorzeitigen Absterbens einiger Zellen im Klon. Es entstehen demnach Kolonien mit vitalen und letalen Zellen, sogenannte Mosaike.

Die Ursachen für den Tod oder die Inaktivierung einer Zelle sind vermutlich komplexer Natur. Zytoplasmatische Schäden, Membranstörungen, Schädigungen des Zellteilungsapparates, Chromosomenaberrationen, Punktmutationen und DNA-Defekte können die biologischen Mechanismen empfindlich stören. Es konnten in verschiedenen Untersuchungen ähnliche Empfindlichkeiten für Zellinaktivierung und Chromosomenaberrationen gegenüber ionisierenden Strahlen nachgewiesen werden(PUCK, 1958; BENDER und WOLFF, 1961; GREENBLATT, 1961; HSU et al.,1962; YU und SINCLAIR, 1967; DEWEY et al., 1971; SCOTT et al., 1974). Ebenso wurde ein enger Zusammenhang zwischen Chromosomenaberrationen und verminderter Proliferationsfähigkeit postuliert (YU und SINCLAIR, 1967; DEWEY et al., 1971; GROTE, 1972; CARRANO, 1972; 1973 a; b; LLOYD et al., 1975). Sichtbare Chromosomenaberrationen wurden demnach als letale Mutationen angesehen.

In den letzten Jahren sind Zweifel entstanden, ob die angewandten Methoden, die mit der mathematischen Interpretation von Dosiseffektkurven auf Primärereignisse und Wirkungsmechanismen schliessen, in allen wesentlichen Punkten richtig sind (FRITZ-NIGGLI und BLATTMANN, 1969; TÖLLNER, 1973; BARENDSEN, 1975; 1979; HAGEMANN, 1976). Für qualitative Aussagen über die strahlengeschädigte Zelle und ihre Reproduktionsfähigkeit müssen Strahlenintensität, Dosis und Phase im Zellzyklus sowie die Zeitspanne zwischen Induktion und Auswertung berücksichtigt werden.

Im folgenden interessiert die Frage, ob und wie die Mikro- und Makrokoloniebildung einer strahlengeschädigten Zelle mit sichtbaren Chromosomenaberrationen zusammenhängen. Als Ausgangspunkt dient die Beobachtung von CARRANO (1972), dass synchrone Zellen,d.h. Zellen, die sich zur gleichen Zeit in der gleichen Zellzyklusphase befinden, nach Bestrahlung zu unterschiedlichen Zeiten mit verschiedenen Raten von Chromosomenaberrationen in die folgende Mitose gelangen. Einerseits werden in getrennten Fraktionen die zu verschiedenen Zeiten nach der Bestrahlung in die erste Mitose gelangenden Zellen gesammelt, als klonale Stammzellen ausgesät und auf ihre Mikro- und Makrokoloniebildung geprüft. Anderseits werden in parallelen Proben die entsprechenden Chromosomenaberrationen untersucht. Die Verteilung der Aberrationen wird den entsprechenden Häufigkeiten von Mikro- und Makrokolonien gegenübergestellt.
Zusätzlich interessiert die Anzahl Mikrokerne in den Mikro- und Makrokolonien, da Mikrokerne mit grosser Wahrscheinlichkeit als azentrische Chromosomenfragmente anzusehen sind (MCLEISH, 1954; SCHMID, 1975; 1976; HEDDLE und CARRANO, 1977).

2. MATERIAL und METHODEN

2.1. Zellinie

Für die Untersuchung stand zunächst eine junge, heterogene Zelllinie (19/1) embryonaler Fibroblasten des Chinesischen Hamsters zur Verfügung. Da diese Zellinie statt kompakter Zellkolonien weitflächige und verstreute Zellagglomerate bildete, wurde nach einer Anleitung von THIESSEN (1972) ein Klon mit kompaktem Koloniewachstum isoliert und weitergezüchtet (Abb. 1). Die Auswertung eng benachbarter Zellkolonien wurde bei der neu gewonnenen Sublinie erleichtert.

Das Nährmedium bestand aus Eagle's Basal Medium (Gibco G-12) mit 16% foetalem Kälberserum, 1.6 g/l Natriumbicarbonat, 17 mg/l Phenolrot und Antibiotika-Zusatz (Gibco 524). Die Zellen wurden bei 37°C und 5% CO_2-Atmosphäre in Pyrex Milk-Dilution-Flaschen gezüchtet und zweimal wöchentlich mit Trypsin behandelt.

Zellen können sich im Laufe der Kultivierung biochemisch, zytologisch oder genetisch verändern. Es wurde deshalb Zellmaterial als Reserve unter Zusatz von 1o% Dimethylsulfoxid eingefroren (MAUERSBERGER, 1971). Die Zellen wurden in Glasampullen versiegelt und in flüssigem Stickstoff gelagert. Um stets mit dem gleichen Ausgangsmaterial zu arbeiten, wurde alle 4-5 Monate Zellmaterial aufgetaut.

NIH Thioglycollate Broth (Difco o257-o1) diente bei allen Nährlösungen als Testmedium zu deren Sterilitäts-Prüfung (THIESSEN, 1972).

Zellkulturen sind häufig durch Mycoplasmen (PPLO) kontaminiert. Der PPLO-Test nach PAIN und SMITH (1973) wurde alle zwei Monate routinemässig durchgeführt. Verdächtige Zellkulturen wurden sofort eliminiert.

Die Chromosomenzahl war in 7o% aller Zellkerne diploid (2n=22). Die aneuploiden Genome zeigten Hyperdiploidie mit 23 (1o%) und 24 (1o%) Chromosomen und Hypodiploidie mit 21 (8%), 19 und 2o (2%) Chromosomen enthaltenden Karyotypen.

2.2. Zellzyklusdauer

Die Zellzyklusdauer wurde nach der Methode von STUBBLEFIELD (1968) ermittelt. Es wurde wie folgt vorgegangen: Ca. 10^5 Zellen/ml wurden in Plastik-Petrischalen von 60 mm Durchmesser, die Thermanox-Deckgläser enthielten, ausgesät. Allen angesetzten Zellkulturen wurden in der exponentiellen Wachstumsphase gleichzeitig ^{3}H-Thymidin (Schwarz/Mann; spez. Akt. 6 Ci/mM) mit der Konzentration von 2 μCi/ml für 15 Minuten beigegeben. Anschliessend wurden die Zellen auf den Thermanox-Deckgläsern zweimal in konditioniertem Medium gewaschen und weiter verarbeitet. Mit stündlichen Intervallen nach der Pulsmarkierung (1-24 h) wurden die Zellen fixiert. Die Präparate wurden mit Kodak AR-10 Stripping-Film überzogen, bei 4°C während 8 Tagen exponiert und anschliessend in Kodak D-19 während 5 Minuten bei 14°C entwickelt. Die Zellen wurden in Soerensen-Phosphat-Puffer pH 6.9 mit 3% Giemsa gefärbt und in Eukitt eingebettet. Für jedes Präparat wurden der Mitoseindex und das Verhältnis von markierten zu unmarkierten Mitosen bestimmt. Es wurden pro Intervall je 300 Mitosen ausgezählt. Der Mitoseindex über 24 h betrug 2.14 $\pm$ 0.1 %. Der ganze Zellzyklus dauerte ca. 16 h. Davon entfielen 4 h auf die G_1-Phase, 9 h auf die S-Phase, 2½ h auf die G_2-Phase und 30 Minuten auf die Mitose.

2.3. Zellklonierung

Die von PUCK und MARCUS (1956) entwickelte Methode zur Prüfung der Reproduktionsfähigkeit bestrahlter Zellen in vitro wurde in modifizierter Form angewendet. Die Kultivierung und Untersuchung der aus den Stammkulturen gewonnenen Versuchszellen erfolgte in Plastik-Petrischalen mit 60 mm Durchmesser. Einzelzellen in Suspension wurden durch Behandlung von 2 Tage alten Stammkulturen mit 0.075%igem Trypsin (Difco 0153-59) während 5 Minuten bei 37°C erhalten. Von dieser Suspension wurden nach Verdünnung jeweils ca. 600 Zellen auf eine Petrischale mit 3 ml konditioniertem Nährmedium (I Tag alt) übertragen. Die Zellen setzten sich

innerhalb einer Stunde am Petrischalenboden fest und gingen von der sphärischen Suspensionsform in eine flach ausgebreitete Form über. Für einige Petrischalen wurde die angesetzte Zellzahl ermittelt. Die Zahl wurde später mit der Anzahl gewachsener Klone verglichen und der Quotient als Mass für die Proliferationsfähigkeit der ursprünglich angesetzten Zellen betrachtet (= PE: Plating efficiency). Zwei Stunden nach dem Aussäen der Zellen erfolgte die Bestrahlung mit unterschiedlicher Dosis. Ein vorgewärmter, luftdicht abschliessender Deckel aus Polypropylen (PP) wurde auf die Petrischalen gepresst, um diese in jeder beliebigen Lage bestrahlen zu können. Die Petrischalen wurden auf einen Wassertank von 37°C gelegt. Nach der Bestrahlung wurde das Medium durch unbestrahltes, vorgewärmtes konditioniertes Medium ersetzt. Die unbestrahlten Zellen erfuhren ausser der Bestrahlung die gleiche Behandlung.
Anderntags wurde das konditionierte Medium durch frisches Nährmedium ausgetauscht und o.5% Agar darüber geschichtet. Die Agarzugabe verhindert die Konvektion des Mediums und vermindert den Verlust von Metaboliten aus den Zellen (SCHINDLER, 1965). Ausserdem unterdrückt sie die Neigung der Zellen zur Wanderung.
Nach 8 Tagen wurden die Zellklone mit einem Methanol-Eisessig-Gemisch von 3:1 fixiert und in Soerensen-Phosphat-Puffer pH 6.9 mit 3% Giemsa für 3o Minuten gefärbt. Die Bestimmung der Klonausbeute erfolgte durch Zählen der Anzahl Klone auf dem Schalenboden.
Für eine qualitative Beurteilung der Koloniebildungsfähigkeit diente die Analyse der Klongrössenverteilung. Alle sichtbaren Klone wurden in Grössenklassen eingeteilt. Die Klassengrenzen wurden willkürlich festgelegt. Klasse I umfasst Kolonien mit 2-9 Zellen pro Kolonie, in der Klasse II sind Kolonien mit 1o-29 Zellen pro Kolonie enthalten, Klasse III beinhaltet Kolonien mit 3o-49 Zellen, und in der Klasse IV sind die sogenannten vitalen Zellkolonien mit 5o und mehr Zellen enthalten (Abb. 1-3).

2.4. Zellsynchronisierung

Die Strahlensensibilität in bezug auf die Zellinaktivierung und Chromosomenaberrationen hängt von der Position der Zelle im Zellzyklus zur Zeit der Bestrahlung ab (SINCLAIR, 1968; WOLFF,1968). Für den Bestrahlungszeitpunkt wurde die frühe G_1-Phase gewählt, weil synchrone Zellen schnell desynchronisieren und weil die in der Mitose auftretenden Chromosomenaberrationen leicht zu beurteilen sind.

Die induzierten Typen von Chromosomenaberrationen sind in der folgenden Mitose als asymmetrischer Austausch von Chromosomenstücken, dizentrische Chromosomen, Ringchromosomen, azentrische Fragmente, "Minutes" und Chromosomenbrüche feststellbar (Systematik der Chromosomenaberrationen: Review bei COMINGS, 1974; REVELL, 1974). Nicht berücksichtigt wurden Inversionen oder symmetrische Translokationen, weil sie in mitotischen Säugetierzellen mit den in der vorliegenden Arbeit beschriebenen Färbemethoden nicht sichtbar gemacht werden können.

Als eine möglichst natürliche Synchronisationsmethode wurde die Abschüttelungstechnik der mitotischen Zellen gewählt (TERASIMA und TOLMACH, 1963; STUBBLEFIELD, 1968).

Die Anreicherung von mitotischen Zellen und deren Ausbeute aus einer asynchron wachsenden Zellpopulation kann durch Colcemidzugabe erhöht werden (STUBBLEFIELD, 1968); kleine Mengen von Colcemid haben keinen Einfluss auf die DNS-, RNS- oder Proteinsynthese (PRESCOTT und BENDER, 1962; STUBBLEFIELD, 1964; 1967; TAYLOR, 1965; ROHMSDAHL, 1968).

In einem Vorversuch wurde die Colcemidkonzentration für einen wirksamen Mitoseblock ermittelt (0.037 μg/ml (10^{-7}M) (SEROMED) Zugabe für eine Stunde), ohne dabei die Zellen sichtbar zu schädigen. Als geschädigt betrachtete ich polyploide und pyknotische Zellen. Der Mitoseblock löste sich ca. 1 Stunde nach Colcemidentfernung.

Monolayer-Zellkulturen in der exponentiellen Wachstumsphase wurden mit 40 ml Nährmedium in 600 ml Pyrex-Flaschen für 3 Minuten gleichmässig geschüttelt. Bei anschliessendem Mediumwechsel wur-

den die abgelösten Zellen entfernt. 3/4 Stunden später erfolgte die Zugabe von Colcemid mit der Endkonzentration von o.o37μg/ml für eine Stunde. Danach wurden die mitotischen Zellen durch zweiminütiges Schütteln der Zellkulturen abgelöst und die gewonnene Zellfraktion als 1. Sammlung bezeichnet. Die gesammelten mitotischen Zellen wurden nach der Zentrifugation (25o g für 5 Minuten) und hypotonischer Behandlung (o.17% NaCl für 2o Min. bei 2o^{0}C) in Methanol-Eisessig (Mischung 3:1) schonend fixiert und während längerer Zeit bei 4^{o}C in konzentriertem Fixierungsmittel belassen. Die Zellsuspension wurde auf nasse Objektträger aufgetropft und getrocknet. Die Präparate wurden in einer Orceinlösung für 2 Stunden bei 5o^{o}C gefärbt, anschliessend nach der Methode von SCHWARZACHER (197o) aufgearbeitet und in Eukitt eingebettet. Diese erste Sammlung von mitotischen Zellen diente zur Untersuchung und Bestimmung der spontanen Rate von Chromosomenaberrationen.

Die zweite Abschüttelung der mitotischen Zellen (2 Min.) geschah nach dem Ende des Mitoseblocks, d.h. eine Stunde nach der Colcemidentfernung. Diese zweite Fraktion wurde in zwei verschieden grosse Proben geteilt. Die grössere Fraktion wurde für 5 Min. bei 2oo g zentrifugiert und der Ueberstand verworfen. Die Zellen des Rückstandes wurden in einem grossen Reagenzglas in vorgewärmtem, konditioniertem Medium resuspendiert und anschliessend in der gewünschten Dichtekonzentration für Klonierungsexperimente ausgesät.

Die synchronen Zellen wurden in der frühen G_1-Phase, d.h. 2 Stunden nach dem Ausplatten, bestrahlt.

Die zweite, kleinere Probe von mitotischen Zellen wurde parallel dazu nach der gleichen Methode wie die mitotischen Zellen der ersten Sammlung aufgearbeitet. Unter dem Mikroskop wurde der Anteil Mitosen auf 2ooo Zellen ermittelt. Befanden sich weniger als 9o% aller Zellen in der Mitose, so wurde der Versuch nicht weiter ausgewertet.

2.5. Experimenteller Ablauf der Zellklonierungsanalyse und der parallel dazu durchgeführten Bestimmung der Chromosomenaberrationen

Die mitotischen Zellen der 2. Sammlung wurden mit je 1 ml konditioniertem Nährmedium gleichzeitig in 16 kleine, gut verschliessbare, für Zellkulturen geeignete Plastikröhrchen mit 5.5 cm^2 Oberfläche (NUNC, N 14o9) ausgeplattet. Zwei Stunden später erfolgte die Bestrahlung aller Zellen bei 37°C. Die Zellen gelangten infolge Heterogenität über eine grössere Zeitspanne nach dem Aussäen in die darauffolgende Mitose. In Vorversuchen zeigte sich, dass die Zellen zwischen 16 und 3o Stunden nach dem Aussäen den ersten Zellzyklus beenden. Für die Versuche wurden Zellen, die zwischen 16 und 26 h nach dem Ausplatten in die erste Mitose gelangten, berücksichtigt.
Für die Zellklonierungsanalyse und die parallel dazu durchzuführende Bestimmung der Chromosomenaberrationen wurde 16 h nach dem Aussäen der Zellen je ein Röhrchen abgezweigt und folgendermassen weiter verarbeitet: Der Probe für die Analyse der Chromosomenaberrationen wurde Colcemid von o.111 μg/ml (3x lo^{-7}M) für 2 Stunden zugegeben. Alle zwischen 16-18 h nach dem Aussäen in die Mitose gelangenden Zellen wurden dadurch in der Metaphase arretiert. Die metaphasischen Zellen wurden anschliessend nach der früher beschriebenen Methode hypotonisch behandelt und sorgfältig fixiert. Der ebene Boden des Röhrchens, auf dem die Zellen wuchsen, wurde herausgeschnitten und auf einen Objektträger aufgeklebt. Nach der oben erwähnten Methode wurden die Chromosomen mit Orcein gefärbt. Die Auswertung der Chromosomenaberrationen für die Fraktion mit einer Zellzyklusdauer von 16-18 h geschah unter dem Mikroskop. Es wurde ebenfalls der Mitoseindex bestimmt.
Das beschriebene Prozedere wurde in zweistündigen Intervallen bis 28 h nach dem Aussäen mit weiteren Röhrchen wiederholt (Schema des experimentellen Ablaufs siehe Abb. 4).
Der parallelen Probe für die Zellklonierungsanalyse wurde für eine Stunde Colcemid von o.o37 μg/ml zugegeben. Alle zwischen 16 und 17 h in die Mitose gelangenden Zellen wurden dadurch arre-

tiert. Anschliessend konnten die metaphasischen Zellen mit 1 ml Trypsin durch Schütteln während 3o Sekunden abgelöst werden. Die Zellsuspension mit den Mitosen wurde in eine Petrischale mit 3 ml konditioniertem Medium gebracht. Die mitotischen Zellen setzten sich nach einer bestimmten Zeit auf dem Petrischalenboden fest und konnten die Zellteilung beenden. Nach 1 $1/4$ Stunden wurden die aus einer Zellteilung hervorgegangenen Tochterzellen unter dem Phasenkontrastmikroskop beobachtet und ihre genaue Position mittels eines Koordinatensystems festgehalten. Es wurden nur isolierte Tochterzellen beobachtet, die alleine, d.h. ohne irgendwelche Nachbarschaftszellen, im Blickfeld unter dem Mikroskop lagen. Dadurch sollte eine Fehlbeurteilung durch den Einfluss anderer Zellen bei der späteren Bestimmung der Klongrösse weitgehend ausgeschlossen werden. In der Probe wurden 5o Tochterzellen ausgewählt. Anschliessend wurde das Medium durch konditioniertes Medium ersetzt.

17 h nach dem Aussäen der synchronen Zellen wurde eine weitere Probe für die Zellklonierungsanalyse isoliert, die Zellen wurden gleich behandelt wie diejenigen in der vorhergehenden Probe, und es wurden ebenfalls 5o Zellpaare beobachtet. Somit standen von den beiden Proben für die Zellklonierungsanalyse loo beobachtete klonale Stammzellen zur Verfügung. Die Sammlung in stündlichen Intervallen geschah bis 26 h nach dem Aussäen. Anderntags wurde in allen Petrischalen das Medium durch frisches Nährmedium ersetzt und Agar von o.5% darübergeschichtet. Nach 8 Tagen erfolgte die Fixierung und Färbung der Klone nach der früher beschriebenen Methode. Zur Bestimmung der Koloniegrössen wurden die Petrischalen mit den Koordinaten der ursprünglichen Tochterzellen positioniert.

Die Kontrollversuche ohne Bestrahlung erfolgten unter gleichen Bedingungen. Ein weiteres Kontrollexperiment war mit der Frage verknüpft, inwiefern die zweite Colcemidzugabe einen Einfluss auf die Proliferationsfähigkeit der Zellen oder der Chromosomenaberrationen ausübt. Zellen, die 2o-22 h nach der Synchronisation in die Mitose gelangten, wurden ohne Arretierung durch Colcemid in $1/4$-stündigen Intervallen mit Trypsin abgeschüttelt und in

Nährmedium auf Petrischalen ausgeplattet. Die weitere Behandlung für die Analyse der Koloniegrössen geschah nach der früher beschriebenen Anleitung. Für die Bestimmung der Chromosomenaberrationsrate während dieser Zeit wurden in $1/2$-stündigen Intervallen die metaphasischen Zellen hypotonisch behandelt und für die Analyse aufgearbeitet. Es konnte kein signifikanter Unterschied in bezug auf die Chromosomenaberrationsrate und auf die Proliferationsfähigkeit zwischen bestrahlten Stammzellen mit und ohne zweite Colcemidbehandlung gefunden werden.

2.6. Bestrahlungsanordnung

Benutzt wurde ein Picker-Röntgengerät mit Berylliumfenster und Wolframanode. Mit dem Ionisationskammer-Dosimeter PTW wurde die Dosismessung in Luft durchgeführt. Die Dosisleistung im Abstand von 49 cm zur Objektebene bei 12 mA, 2oo keV, mit 1 mm Al- und o.25 mm Cu-Zusatzfilterung betrug 47 rad/min mit einer Halbwertschichtdicke (HWS) von o.7 mm in Cu.

2.7. Statistik

Die hier verwendeten Tests zur Prüfung von Hypothesen und Trends wurden am Rechenzentrum der ETH Zürich mit dem CDC Cyber Computer durchgeführt. Folgende Tests wurden gerechnet: Poisson-, Binomial- und negative Binomialverteilung, das nichtparametrische Verfahren von JONCKHEERE (1954) für unabhängige Stichproben auf Trend und die Kontingenztafeln. Benützt wurden das Programmpaket BMD sowie die Subroutinen Library IMSL.

3. RESULTATE

3.1. Koloniegrössen bei unterschiedlicher Strahlendosis: Dosiseffektkurven und Koloniegrössenverteilung

Dosiseffektkurven für das Ueberleben von Zellen aus synchronen, in der frühen G_1-Phase bestrahlten und asynchronen, bestrahlten Zellpopulationen wurden aufgrund ihrer unterschiedlichen Fähigkeit zur Makrokoloniebildung erhalten. In der halblogarithmischen Darstellung (Abb. 5) zeigen die Dosiseffektkurven eine für Röntgenstrahlen charakteristische Schulter im Bereich niedriger Strahlendosen ($\leqslant$4oo rad) und einen anschliessenden einigermassen linear verlaufenden Teil, d.h. die Inaktivierung nimmt bei höheren Strahlendosen exponentiell ab. Die eingezeichneten Mittelwerte resultieren aus je 8 Versuchen. Aus der Darstellung ist ersichtlich, dass synchrone Zellen in der frühen G_1-Phase strahlenresistenter sind als Zellen aus einer asynchronen Zellkultur.

In der Untersuchung wurden zusätzlich zu den Makrokolonien alle Mikrokolonien (2- 49 Zellen) gezählt. In den sogenannten Ueberlebenskurven werden die Mikrokolonien als "nicht überlebend" klassiert. In Abb. 6 ist die dosisabhängige Verteilung aller beobachteten Koloniegrössen einer synchronen Zellkultur in Histogrammen eingetragen, aufgegliedert in die früher beschriebenen Grössenklassen I, II, III und IV. Die prozentualen Häufigkeiten der einzelnen Grössenklassen sind dabei bezogen auf die Gesamtanzahl Kolonien der betreffenden Bestrahlungsdosis. Mit zunehmender Dosis zeigt sich eine Abflachung der Verteilungsmaxima und eine Verschiebung zu kleineren Koloniegrössen. Das Verhältnis zwischen dem Anteil der Kolonien ohne Strahlenschädigung wird mit wachsender Dosis klein gegenüber demjenigen der insgesamt überlebenden Kolonien. Mit zunehmender Dosis nehmen der Zelltod und die Wachstumshemmungen zu.Die Fraktion der Mikrokolonien mit 3o-49 Zellen pro Klon (Klasse III), die bei etwas längerer Kultivationszeit der Zellen die Kolonieüberle-

benskurve für Makrokolonien beeinflussen könnte, nimmt gegenüber den Anteilen der anderen Mikrokolonien-Grössenklassen mit zunehmender Strahlendosis nicht wesentlich zu. Es konnte kein qualitativer Unterschied in der Verteilung von Koloniegrössen zwischen einer asynchron bestrahlten und einer synchron bestrahlten Zellpopulation gefunden werden.

3.2. Analyse der mit 3oo rad in der frühen G_1-Phase induzierten Chromosomenaberrationen im Zusammenhang mit der mitotischen Verzögerung

Es musste eine konstante, tiefe Bestrahlungsdosis gewählt werden, die den Interphasentod auf ein Minimum reduzierte. Da HAGEMANN (1976) nach Bestrahlung von Zellen des Chinesischen Hamsters mit hohen Dosen ($D \geq$ 5oo rad) Interphasentod feststellte, musste für die folgenden Versuche eine tiefe Strahlendosis gewählt werden, damit die Gewähr geboten war, dass alle Zellen den ersten Zellzyklus vollenden konnten. In Vorversuchen zeigten synchrone, in der G_1-Phase mit 3oo rad bestrahlte Zellen, bezüglich der Anzahl erster Mitosen nach der Bestrahlung keine Unterschiede gegenüber den unbestrahlten Zellen.
Die synchronen, in der frühen G_1-Phase mit 3oo rad bestrahlten Zellen gelangten zu unterschiedlichen Zeiten in die darauffolgende Mitose. Der Anteil der mitotischen Fraktion aus einem zweistündigen Sammlungsintervall ist für unterschiedliche Zeiten nach der Synchronisation in Tab. 1 aufgeführt. Es wird eine sichtbare Verzögerung des ersten Zellzyklus nach der Synchronisation gegenüber den in Vorversuchen erhaltenen Werten für die Zellzyklusdauer festgestellt. Diese Verschiebung lässt sich bei bestrahlten wie bei unbestrahlten Zellpopulationen in ähnlichem Umfang feststellen (Abb. 7). Der Mitoseindex variiert mit der Sammlungszeit, wobei tiefe Werte die Extrema der Dauer des Zellzyklus nach der Synchronisation markieren.
In der Tab. 1 sind die Werte aller Chromosomenaberrationen so-

wie der verschiedenen Typen von Chromosomenaberrationen von Zellen, die in 2-stündigen Intervallen zwischen 16-28 Stunden nach der Synchronisation gesammelt wurden, aufgetragen. Die Aberrationstypen wurden eingeteilt in:

- Chromosomenbrüche, "Minutes" (kleine punktförmige Fragmente) und azentrische Fragmente (= chromosomale Deletionen)
- Exchange-,dizentrische - und Ringchromosomen (= sog. "Zwei-Ereignis"-Aberrationen)
- Chromatidbrüche

Chromatidbrüche kommen gegenüber den chromosomalen Deletionen wesentlich seltener vor. Die "Zwei-Ereignis"-Aberrationen werden für die Aberrationsraten doppelt gezählt, da allgemein angenommen wird, dass für deren Zustandekommen zwei Schädigungsereignisse notwendig sind (WOLFF, 1962; REVELL, 1974; SAVAGE, 1976).

Es wurden vier bis fünf Versuche ausgewertet. Mit dem Chi-Quadrat-Test wurde geprüft, ob die einzelnen Versuche bezüglich der Verteilung von Aberrationshäufigkeiten homogen sind und ob folglich die Häufigkeiten innerhalb der einzelnen Sammlungsintervalle zusammengezählt werden dürfen (Tab. 2). Die Verteilungen entsprechen den gleichen Grundgesamtheiten.

In Abb. 8 sind die Raten der verschiedenen Typen von Chromosomenaberrationen nach Abzug der Kontrollwerte in Abhängigkeit von den verschiedenen Sammlungsintervallen graphisch dargestellt.

Die Rate aller Aberrationen nimmt von 16-24 h Sammlungszeit zu und fällt nachher ab. Einen ähnlichen Verlauf zeigen die separat aufgeführten chromosomalen Deletionen und die "Zwei-Ereignis"-Aberrationen. Die Zellfraktion mit einem durchschnittlichen Zellzyklus von 22-24 h nach der Synchronisation weist die grösste durch 3oo rad Röntgenstrahlen hervorgerufene Chromosomenschädigung auf. Mittels einer einfachen Abschätzung wurde geprüft, ob das experimentell festgestellte Maximum für Chromosomenaberrationen der Sammlungsfraktion 22-24 h auf dem 5% oder 1% Niveau signifikant grösser sei als die übrigen Werte:

$$z = \frac{\bar{x}_4 - \frac{1}{5} \sum_{i \neq 4} \bar{x}_i}{\sqrt{s_{\bar{x}_4}^2 + \left(\frac{1}{5}\right)^2 \sum_{i \neq 4} s_{\bar{x}_i}^2}} = 3.06 \qquad p < 0.01$$

z : genähert Standardnormalvariable

$\bar{x}_1 \ldots\ldots \bar{x}_6$: Mittelwerte von Chromosomenaberrationen der 6 Sammlungsintervalle

$s_{\bar{x}_1} \ldots\ldots s_{\bar{x}_6}$: Standardabweichungen der Mittelwerte der 6 Sammlungsintervalle

Die Wahrscheinlichkeit für $z > 3.06$ ist kleiner als 1%, d.h. auf dem 1% Niveau ist das festgestellte Maximum signifikant grösser als die übrigen Werte. Die Rate der Chromatidaberrationen steigt mit zunehmender Zellzyklusdauer kontinuierlich an. Bei der 16-18 h Sammlungsfraktion werden 3% Chromatidaberrationen beobachtet, während die zwischen 26-28 h in die Mitose gelangenden Zellen 11% Chromatidaberrationen aufweisen.
Die "spontane" Rate der Chromosomenaberrationen lag zwischen o.o7-o.19. Weder ein qualitativer noch ein quantitativer Unterschied der spontanen Chromsomenaberrationsrate wurde in Vorversuchen vor und nach der Synchronisation festgestellt.
Für die Bestimmung der durchschnittlichen Rate von Chromosomenaberrationen der gesamten Zellpopulation in der ersten Mitose nach der Bestrahlung müssen die Raten der einzelnen Sammlungszeiten mit deren Mitosenindizes gewichtet werden. Die Rate beträgt o.85 für alle Aberrationen und o.72 für die chromosomalen Deletionen. Die Werte sind in Abb. 8 gestrichelt eingezeichnet.

Viele mit 3oo rad bestrahlte Zellen zeigen keine sichtbaren Chromosomenschäden, während andere Zellen eine Vielfalt und Vielzahl von Chromosomenaberrationen aufweisen. Ferner variieren die Raten der Aberrationen mit den verschiedenen Sammlungszeiten der mitotischen Zellen. Es war nicht auszuschliessen, dass Zellen mit vielen Aberrationen eine starke Mitoseverzögerung gegenüber den wenig geschädigten Zellen aufweisen, so dass sich unterschiedliche Häufigkeitsverteilungen von Aberrationen in den ein-

zelnen Sammlungszeiten einstellen würden. Ich testete diese Hypothese, indem die beobachteten Häufigkeitsverteilungen der Aberrationen pro Sammlungsintervall einer mathematisch-theoretischen Häufigkeitsverteilung gegenübergestellt und die Verteilungen mit dem Chi-Quadrat-Anpassungstest geprüft wurden. Es wurde versucht, eine Poisson-, Binomial- und negative Binomialverteilung (NBV) an die beobachteten Verteilungen zu approximieren. Zwei wichtige Gründe deuteten auf eine negative Binomialverteilung hin: Einerseits weist die Ueberdispersion auf eine NBV hin, d.h. der Dispersionsindex ($D = \frac{s^2}{\bar{x}}$) ist grösser als 1 (Tab 3 und 4), und anderseits wurden zu wenige Zellen in der Klasse o, d.h. Zellen ohne Aberrationen, und zu viele Zellen in der Klasse 1 beobachtet. Für die beobachteten Werte konnte eine NBV am besten angepasst werden. Dabei wurde folgende Formel benützt:

$$P\ (n) = \binom{k+n-1}{n} \left(\frac{pi}{1+pi}\right)^n \left(\frac{1}{1+pi}\right)^k$$

P(n) : Wahrscheinlichkeit, dass man n-Aberrationen beobachtet
pi,k : Parameter der NBV, die aus den Daten geschätz werden müssen. pi und k haben keine biologische Bedeutung.

Die theoretische Häufigkeitsverteilung gibt, gesichert durch den Chi-Quadrat-Test, eine gute Uebereinstimmung mit den beobachteten Häufigkeiten von allen Chromosomenaberrationen einerseits und jener chromosomaler Deletionen anderseits (Tab. 3 und 4). Es muss folglich die Hypothese verworfen werden, wonach die stärker geschädigten Zellen bevorzugt eine Mitoseverzögerung durchmachen. Ein mögliches biologisches stochastisches Modell der negativen Binomialverteilung wird in der Diskussion eingehend erläutert.

In Abb. 9 sind die prozentualen Anteile mitotischer Zellen (p) und die Standardabweichungen von p ($s = \sqrt{\frac{1}{n}\ p\ (1-p)}$) mit verschiedenen Chromosomenaberrationshäufigkeiten in Abhängigkeit von den verschiedenen Sammlungszeiten aufgetragen. Die Klasse o beinhaltet den prozentualen Anteil von mitotischen Zellen ohne Aberrationen, Klasse 1 jenen von einer Aberration und Klasse 2

denjenigen von zwei und mehreren Aberrationen. Das Profil der o-Klasse verläuft annähernd umgekehrt proportional zu dem Profil der Chromosomenaberrationsraten. Zwischen 22-24 h nach der Synchronisation wurden 37% klonale Stammzellen ohne zytologische Schädigung gefunden, während der Anteil am Anfang der Sammlungszeit 47%, bzw. 52% für die letzte Sammlungszeit betrug. In der Klasse 1 unterscheiden sich die einzelnen Sammlungsfraktionen nicht wesentlich, während der Anteil schwer geschäditer Zellen (Klasse 2) von 16-24 h nach der Synchronisation zunimmt und nachher wieder abfällt.
Der Anteil ungeschädigter mitotischer Zellen der Kontrolle bewegt sich zwischen 91% bis 83%.
Zellen mit"Zwei-Ereignis"-Aberrationen sind selten vertreten, so dass deren mengenmässiger Einfluss auf die Koloniebildung als äusserst gering beurteilt wird (siehe Diskussion). In der Abb. lo sind die prozentualen Anteile von Stammzellen mit einer oder mehreren "Zwei-Ereignis"-Aberrationen in Abhängigkeit von der Zeit nach dem Aussäen der synchronen Kultur eingezeichnet. Die Werte liegen zwischen 3% und 6%. Ebenfalls aufgetragen sind die Häufigkeiten der chromosomalen Deletionen, wobei die bereits früher beschriebenen Klasseneinteilungen benützt wurden. Die Profile der o- und der 1-Klasse zeigen eine abnehmende bzw. zunehmende Tendenz bis zur Sammlungsfraktion 22-24 h. Das Profil der o-Klasse nimmt einen ähnlichen Verlauf wie dasjenige der o-Klasse von allen Chromosomenaberrationen. Die Anteile schwer geschädigter Zellen (Klasse 2) sind für diese Aberrationstypen zurückgegangen, d.h. die "Zwei-Ereignis"-Aberrationen und die Chromatidaberrationen sind insbesondere in Zellen mit chromosomalen Deletionen zu suchen.
Die Anteile der o-Klasse bei den Kontrollen für chromosomale Deletionen liegen zwischen 93%-87%.

3.3. Analyse der Klongrösse nach einer konstanten Bestrahlungsdosis der Stammzellen mit 3oo rad in der frühen G_1-Phase

Die bestrahlten und unbestrahlten Stammzellen wurden in der darauffolgenden Mitose gesammelt und ausgeplattet. Zwei Stunden später wurden die Tochterzellen unter dem Mikroskop beobachtet, und nach 8 Tagen wurde die Grösse der davon ausgehenden Kolonien bestimmt. Die interphasische Inaktivierung der Elterngeneration durch die Bestrahlung wurde daher nicht in die Untersuchung einbezogen. Auch Zelltod in der ersten Mitose durch Mitoseschwierigkeiten wurde nicht berücksichtigt. In Tab.5 sind die prozentualen Verteilungen der Koloniegrössen in Abhängigkeit von der ersten Zellzyklusdauer nach Bestrahlung der Ursprungszelle aufgetragen. Die Zahlenwerte der Tabelle lassen sich graphisch besser überblicken (Abb. 11). Der Anteil der Makrokolonien nimmt mit zunehmender Zellzyklusdauer konstant ab. Bilden noch 52.2% aller bestrahlten und beobachteten Ursprungszellen mit einem ersten Zellzyklus von 16-18 h eine Makrokolonie, so sinkt deren Anteil auf 33.4% bei einer ersten Zellzyklusdauer von 24-26 h.

Mittels eines nicht-parametrischen Trend-Tests von JONCKHEERE (1954) wurde geprüft, ob die festgestellte Abnahme signifikant sei. Es wurde in der Nullhypothese angenommen, dass alle Werte der gleichen Grundgesamtheit entstammen, während in der Alternativhypothese ein kontinuierlicher Trend abwärts angenommen wurde. Getestet wurde die Nullhypothese gegen die Alternativhypothese, wobei bei einem p von o.oo2 die erste Annahme verworfen wurde. Es wurde folgende Formel benützt:

$$S = 2 \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1+i}^{k} \sum_{\alpha=1}^{m_i} \sum_{\beta=1}^{m_j} P_{i\alpha j\beta} - \sum_{i=1}^{k-1} \sum_{j=1+i} m_i m_j$$

S= Test-Statistik: Anzahl Paare ($x_{i\alpha} > x_{j\beta}$)

k= Anzahl Beobachtungszeiten

$P_{i\alpha j\beta}$= 1, falls ($x_{i\alpha} > x_{j\beta}$), sonst o

Umgekehrt verhält es sich mit demjenigen Anteil der Zellen, der keine Kolonien bildet, d.h. abstirbt. Ursprungszellen mit einem

langen ersten Zellzyklus haben eine statistisch gesicherte grössere Wahrscheinlichkeit einen Zelltod zu erleiden , als diejenigen mit einem kurzen ersten Zellzyklus. Die reproduktiv letal geschädigte Stammzelle durchläuft einen ersten Zellzyklus, vollendet die Mitose und bildet anschliessend Tochterzellen. In der weiteren Entwicklung innerhalb von 8 Tagen sterben alle Nachkommen ab. Aus der vorliegenden Untersuchung ist nicht ersichtlich in welchem Zellzahlstadium der Klon abstirbt.
In Abb. 11 sind in Abhängigkeit von der Sammlungszeit der bestrahlten Stammzellen die prozentualen Anteile der drei verschiedenen Mikrokolonienklassen aufgetragen. Alle drei Profile zeigen keinen Trend, d.h. es werden, unabhängig von der ersten Zellzyklusdauer der Stammzelle und von den verschiedenen Raten der Chromosomenaberrationen, immer ungefähr gleich viele Mikrokolonien gebildet. Zahlenmässig sind die kleinen Kolonien mit je 2-9 Zellen am häufigsten vertreten, gefolgt von den Mikrokolonien mit je lo-29 Zellen. Die frühere Beobachtung, dass die Mikrokolonienklasse III (3o-49 Zellen pro Kolonie) immer den kleinsten Anteil aller Kolonien bildet, trifft auch hier zu. Die Werte aller Mikrokolonienklassen aus bestrahlten Stammzellen liegen über denen der entsprechenden Kontrollen.
Die unbestrahlten Stammzellen bilden, unabhängig von der ersten Zellzyklusdauer, durchschnittlich 62.4% Makrokolonien, resp. 16.6% Mikrokolonien (PE= 79%). Die erhaltenen Prozentwerte werden auf loo% transponiert.
Die Anteile der Kolonien aus bestrahlten Ursprungszellen werden entsprechend korrigiert und mit den Mitosenindizes der einzelnen Sammlungsfraktionen gewichtet. Somit kann der eigentliche biologische Strahleneffekt bezüglich der Makrokoloniebildung abgelesen werden. 69.9% aller mit 3oo rad in der G_1-Phase bestrahlten Zellen bilden Makrokolonien. Dieser Wert liegt ein wenig tiefer als derjenige in der ursprünglichen Dosiseffektkurve (Abb. 5), was vermutlich auf die verschiedenen Methoden zurückzuführen ist.
Morphologische Veränderungen können nur an markanten Merkmalen

erfasst werden. Beobachtet wurden vor allem in den Mikrokolonien deutlich vergrösserte, einkernige Zellen, sog. Riesenzellen (Abb. 3); mehrkernige Zellen, entstanden durch verhinderte Zellteilungen; sichtbare Zerstörungen einzelner Plasmabezirke oder des gesamten Zellplasmas und "Kernrosetten" mit innerem Plasmaeinschluss (Abb. 2). Bei einigen Kolonien bildeten die Zellen keine kompakten Agglomerate, sondern nur verstreute Gruppen.

3.4. Mikrokerne und Mitosenhäufigkeiten in den einzelnen Zellkolonien

In der Anaphase einer Mitose werden azentrische Chromosomenfragmente oft nicht auf die Tochterkerne verteilt; sie runden sich ab und erscheinen in der folgenden Interphase in einer der beiden Zellen als Mikrokerne (MCLEISH, 1965; SCHMID, 1975; 1976; HEDDLE und CARRANO, 1977). Mit wenigen Ausnahmen replizieren und kondensieren Mikrokerne bildende Fragmente nicht (DAS, 1962), daher sind die entsprechenden Chromosomenfragmente in den späteren Mitosen nicht mehr sichtbar.
Es wird nach einem quantitativen Zusammenhang zwischen der Anzahl Mikrokerne pro Klon und den ursprünglich induzierten chromosomalen Deletionen gesucht. Gezählt wurden in den Zellkolonien alle Mikrokerne für unterschiedliche Sammlungszeiten der Stammzellen.Die Anzahl Zellkolonien der vier Grössenklassen mit den entsprechenden Mikrokernen pro Zellkolonie sind in Tab. 6 aufgezeichnet und in Tab. 7 statistisch ausgewertet. Die Anzahl Mikrokerne pro Kolonie wurden in willkürliche, aber aufgrund sorgfältiger Prüfung homogen erscheinenden Grössenklassen (o-2, 3-5 und ≥ 6 Mikrokerne pro Klon) eingeteilt.
Die Kontrollwerte aller Sammlungsintervalle (16-26 h) sind zusammengefasst, weil keine signifikanten Unterschiede festgestellt wurden. Als Grundgesamtheit dienten alle beobachteten Zellkolonien einer ursprünglichen Sammlungsfraktion.
Die Mehrzahl der unbestrahlten wie der bestrahlten Makrokolo-

nien besitzt o-2 Mikrokerne pro Klon (6o% bzw. 45-52%). Die Anzahl Mikrokerne pro Kolonie nimmt umgekehrt proportional zur Gesamtzahl der Kolonien zu. Zur Prüfung auf Homogenität der Häufigkeitsverteilungen von Makrokolonien aus Klassen mit unterschiedlicher Mikrokernzahl pro Klon über die einzelnen Sammlungsfraktionen wurde eine Analyse von Mehrfeldertafeln durchgeführt (Tab. 7). Der erhaltene Wert des Chi-Quadrat Tests ist auf dem 5% Niveau nicht signifikant: die Unterschiede der Häufigkeitsverteilungen von Makrokolonien in den einzelnen Sammlungsfraktionen sind folglich eher zufälliger Natur. Bei der anschliessenden Prüfung auf Homogenität der Häufigkeitsverteilungen von Makrokolonien aus bestrahlten und unbestrahlten Stammzellen mit den entsprechenden Mikrokernen pro Klon konnte ich keinen Unterschied sichern. Gefunden wurden für alle Klasseneinteilungen (o-2; 3-5 und $\geq$ 6 Mikrokerne pro Klon) ähnliche Häufigkeiten von Makrokolonien in der Kontrolle als auch aus bestrahlten Zellkulturen.
Eine Homogenität der Häufigkeitsverteilungen aller bestrahlten Mikrokolonien mit o-2 Mikrokernen pro Klon kann für alle Sammlungsfraktionen mit hoher Wahrscheinlichkeit angenommen werden ($o.8o > p > o.7o$). Die Häufigkeitsverteilungen der bestrahlten und unbestrahlten Mikrokolonien mit o-2 Mikrokernen pro Klon sind homogen ($o.5o > p > o.4o$). Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann kein kausaler Zusammenhang zwischen der Anzahl Mikrokerne in den Kolonien und den ursprünglich induzierten chromosomalen Deletionen in den Stammzellen festgestellt werden.

Weiterhin interessierte die Anzahl Mitosen einer Kolonie als Gradmesser der Proliferationsfähigkeit der Zellen in den betreffenden Kolonien. Die Anzahl Mitosen einer Kolonie würde dann weitgehend von der Koloniegrösse abhängen. Kleine Makrokolonien von 1oo Zellen sollten also weniger Mitosen enthalten als grosse Kolonien von 3oo-4oo Zellen. Ich prüfte diese Annahme, indem von je 5o Makrokolonien mit o-1 Mitose pro Klon bzw. 4 Mitosen pro Klon die Fläche als Mass der Koloniegrösse bestimmt wurde. Aus unbehandelten Zellen hervorgehende Makrokolonien mit o-1 Mi-

tose pro Klon sind durchschnittlich o.12 $\pm$o.o2 mm^2 gross, die Makrokolonien mit 4 Mitosen pro Klon weisen eine Fläche von o.31 $\pm$o.o2 mm^2 auf. Die Unterschiede lassen sich mit dem t-Test auf dem 1% -Niveau sichern. Desgleichen testete ich die Fläche der Makrokolonien von bestrahlten Kulturen. Auch hier sind die Flächenunterschiede (Fläche der Makrokolonien mit o-1 Mitose pro Klon und 4 Mitosen pro Klon : o.21 $\pm$o.o2 mm^2 bzw. o.4o $\pm$o.o3 mm^2) auf dem 1%-Niveau signifikant verschieden. Dabei besitzen die Makrokolonien mit o-1 und 4 Mitosen pro Klon, die aus bestrahlten Zellen abstammen, wesentlich grössere Flächen als die aus unbestrahlten Zellen hervorgehenden Makrokolonien.
Es stellt sich die Frage, ob eine Beziehung zwischen den ursprünglich induzierten Chromosomenaberrationen, dem zeitlich unterschiedlichen ersten Zellzyklus der Stammzelle und dem evtl. verminderten Mitosenanteil einer Kolonie besteht. Die Häufigkeitsverteilungen der aus bestrahlten Stammzellen hervorgegangenen Makrokolonien mit den entsprechenden Mitosen pro Klon (o-1, 2-3 und$\geq$4-n Mitosen pro Klon) der einzelnen Sammlungsfraktionen wurden auf Homogenität geprüft (Tab. 7). Es konnte kein Unterschied gesichert werden, d.h. unabhängig von dem zeitlich verschiedenen ersten Zellzyklus und den verschiedenen induzierten Raten von Chromosomenaberrationen sind die Häufigkeitsverteilungen in allen Sammlungsfraktionen nicht verschieden. Mit einer hohen Wahrscheinlichkeit ($p<$o.ol) sind die Häufigkeitsverteilungen der Makrokolonien aus Klassen mit unterschiedlicher Mitosenzahl pro Klon, ausgehend von bestrahlten Stammzellen, verschieden von denjenigen aus unbestrahlten Kontrollen.
Auf dem 5%-Niveau gesicherte Unterschiede zwischen den einzelnen Sammlungsfraktionen finde ich beim Prüfen der Häufigkeitsverteilungen der Mikrokolonien aus bestrahlten Stammzellen mit o-1 Mitose pro Klon (Tab. 7). Die Häufigkeit der Mikrokolonien der Klasse III nimmt mit zunehmender Sammlungszeit der Stammzellen zu. Klonale Stammzellen mit einem langen ersten Zellzyklus bilden mehr Mikrokolonien der Klasse III mit o-1 Mitose pro Klon als diejenigen mit einem kurzen ersten Zellzyklus. Die Häu-

figkeitsverteilungen ändern sich entsprechend der Dauer des ersten Zellzyklus. Die Anzahl Mikrokolonien der Klasse III weist zur Gesamtzahl aller ausgeplatteten klonalen Stammzellen ebenfalls eine steigende Tendenz mit zunehmender Sammlungsfraktion auf; die Unterschiede lassen sich jedoch statistisch nicht sichern (Abb. 11).
Prüfen wir die Häufigkeiten von Mikrokolonien aus bestrahlten und unbestrahlten Zellen der Klasse I und III mit o-1 Mitose pro Klon auf deren Homogenität (Tab. 7), so kann kein Unterschied festgestellt werden.

3.5. Makrokoloniebildung und ihre Beziehung zu den Chromosomenaberrationen

Die prozentualen Anteile von bestrahlten Stammzellen ohne Aberrationen in Abhängigkeit von den Sammlungsintervallen wurden bestimmt zur Untersuchung einer möglichen Korrelation zwischen der Makrokoloniebildung als Kriterium für das Zellüberleben und der Zahl von Chromosomenaberrationen. Dabei wurde die Annahme zugrunde gelegt, dass bestrahlte Stammzellen ohne sichtbare Chromosomenschäden eher Makrokolonien bilden als diejenigen mit Schäden (Abb. 12). Zudem sind in der Abbildung die prozentualen Anteile von bestrahlten, klonalen Stammzellen mit der Fähigkeit zur Makrokoloniebildung eingetragen. Die Werte wurden um die als 1oo% festgelegte Kontrolle bezogen. Die Anteile von Zellen ohne Aberrationen korrelieren dabei mit den Anteilen gebildeter Makrokolonien bis zum letzten Sammlungsintervall. Obwohl 48% der Stammzellen der letzten Sammlungsfraktion ohne Aberrationen sind, besitzen sie eine kleinere Ueberlebenswahrscheinlichkeit als 32% der Stammzellen ohne Aberrationen mit einer ersten Generationszeit von 22-24 h. Die beobachteten Mikrokolonien in allen Klassen der letzten Sammlungsfraktion weisen keine erhöhte Frequenz gegenüber den vorhergehenden auf, jedoch der Anteil nicht-überlebender toter Zellen nimmt stark zu.

4. D I S K U S S I O N

Die Analyse der Koloniegrössenverteilung zeigte für unterschiedliche Strahlendosen bei einer etwas anderen Versuchsanordnung als im Hauptversuch eine relative Abnahme der Makrokolonien, gepaart mit einer relativen Zunahme der Mikrokolonien bei zunehmender Dosis. Allgemein wird angenommen, dass unterschiedliche Dosiseffekte mit unterschiedlichen Mechanismen der Strahlenschädigung verbunden sind. Mikrokolonien sind als das Produkt einer stehengebliebenen oder verlangsamten Entwicklung zu Makrokolonien zu betrachten. Es können dabei verschiedene, dosisabhängige Einflüsse wie Zelltod oder Zellen mit irreversiblen oder reversiblen Mitosehemmungen eine Rolle spielen.
Für die niedrige Dosis von 3oo rad wurde mit einer Ausnahme eine Korrelation zwischen bestrahlten Zellen ohne sichtbare Chromosomenaberrationen und ihrer Fähigkeit zur Bildung von Makrokolonien gefunden. Dies ist ein weiteres Indiz für die Annahme, dass Kernschäden bei niedrigen Dosen zum Zelltod führen können. In zahlreichen früheren Untersuchungen wurde auf mögliche Beziehungen von Chromosomenaberrationen und Zellinaktivierung hingewiesen (PUCK, 1958; SKARSGARD, 1967; YU und SINCLAIR, 1967; DEWEY et al., 1971; GROTE, 1972; CARRANO, 1972; 1973 a; b; LLOYD et al., 1975; BEDFORD et al., 1978). Anderseits weisen einige Forscher darauf hin, dass vermutlich ein komlexes dosisabhängiges Schadenspektrum zur Zellinaktivierung resp. zum Zelltod führt(BENDER und WOLFF, 1961; GREENBLATT, 1961; FRITZ-NIGGLI, 1968; BARENDSEN, 1975; 1979). So stellten FRITZ-NIGGLI und BLATTMANN (1969) bei Hefezellen fest, dass die sogenannten Inaktivierungskurven aus verschiedenen Schädigungskurven zusammengesetzt sind. Mit zunehmender Dosis kann sich der Typ des Strahlentodes resp. der Inaktivierung ändern.

4.1. Chromosomenaberrationen und Verzögerung des Zellzyklus

Die gefundenen unterschiedlichen Raten der Chromosomenaberrati-

onen in den verschiedenen Sammlungsintervallen von Mitosen nach der Bestrahlung sind eng mit dem verzögerten Zellzyklus verbunden. In früheren Arbeiten wurden ähnliche Befunde bei asynchronen Zellen des Chinesischen Hamsters (HSU et al., 1962) und in natürlich synchronisierten Zellen (BENDER und BREWEN, 1969) gefunden. Es kann angenommen werden, dass die Zellen in der G_1-Phase trotz Synchronisation unterschiedlich sensibel für Chromosomenaberrationen sind. Eine aneuploide Chromosomenzahl in der Stammzelle spielt vermutlich eine unbedeutende Rolle für die Zyklusverzögerung. CARRANO (1972) fand keine unterschiedlichen Verteilungen der Anzahl Chromosomen in den einzelnen Zellen der unterschiedlichen Sammlungsfraktionen.

Die untersuchten Zellen haben nach der Synchronisation einen Zellzyklus durchlaufen. Um keine Mischpopulation von Zellen mit bereits mehreren durchlaufenen Zellzyklen nach der Synchronisation zu erhalten, wurden die Mitosen in der Zeit von 16-28 h nach der Synchronisation gesammelt. Anhand der Mitosenindizes in den Sammlungsfraktionen, die beispielsweise für 14-16 h noch unter 1% liegen (Abb. 7), der durchschnittlichen Zellzyklusdauer von 16 h und des hohen Synchronisationsgrades von über 9o% kann angenommen werden, dass keine Mischpopulation untersucht wurde.

Die Zellen befanden sich mit grosser Wahrscheinlichkeit während der Bestrahlung in der frühen G_1-Phase. Hinweise dafür boten die eine Stunde nach dem Colcemidblock beobachteten mitotischen Zellen, die sich zum grössten Teil im Ana- und Telophasenstadium befanden. In Vorversuchen konnten zum Zeitpunkt der Bestrahlung, d.h. 2 Stunden nach dem Aussäen, weder Mitosen noch mit ^{3}H-Thymidin markierte Zellen in der S-Phase festgestellt werden. Zellen in der Mitose sind in bezug auf Chromosomenaberrationen und Zellinaktivierung strahlensensibel, in der frühen G_1-Phase jedoch strahlenresistent (SINCLAIR, 1968; WOLFF, 1968). Bei einer möglichen Bestrahlung mitotischer Zellen in der vorliegenden Untersuchung müssten entweder die schwer geschädigten Zellen während der Interphase eliminiert oder in der folgenden Mitose

mit einer erhöhten Rate und einer unterschiedlichen Häufigkeitsverteilung von Chromosomenaberrationen in den zeitlich späten Sammlungsfraktionen erfasst werden. Es wiesen jedoch Zellen mit einer mittleren Zellzyklusdauer von 22-24 h die höchste Rate von Chromosomenaberrationen auf und die Häufigkeitsverteilungen der Aberrationen in den Zellen veränderte sich für alle Sammlungsfraktionen nicht signifikant.
Die beobachteten Typen von Chromosomenaberrationen umfassten hauptsächlich chromosomale Deletionen, während die Chromatidaberrationen und die "Zwei-Ereignis"-Aberrationen in sehr geringer Zahl vorkamen. Die dizentrischen Aberrationen waren in ähnlichen früheren Untersuchungen mit Zellen des Chinesischen Hamsters (Linie V-79) wesentlich stärker vertreten (CARRANO, 1973 a). Dieser Unterschied kann auf die unterschiedliche Länge der G_1-Phase der verschiedenen Zellinien zurückzuführen sein. Die Zellen wurden am Anfang einer relativ langen G_1-Phase bestrahlt. In früheren Untersuchungen von HeLa- und L-Zellen wurde beobachtet, dass frühe Stadien einer langen G_1-Phase bezüglich der Zellinaktivierung zu den strahlenresistentesten Phasen des Zellzyklus gehört (WHITMORE et al., 1965; HAHN und BAGSHAW, 1966). Dagegen war die zeitlich kurze G_1-Phase in Zellen des Chinesischen Hamsters der Linie V-79 besonders strahlenempfindlich (SINCLAIR, 1968).
Die beobachtete erhöhte Rate von Chromatidaberrationen mit zunehmender erster Zellzyklusdauer weicht völlig vom Verlauf der übrigen Aberrationstypen ab. Dieser Schadentyp wird vorwiegend im Uebergang der S-G_2- und G_2-Phase induziert, wenn die Schwesterchromatiden repliziert sind, und kann bei der hier verwendeten Versuchsanordnung kaum erwartet werden. Die vorliegenden Befunde stehen offensichtlich in Zusammenhang mit der Länge des Zellzyklus, denn bei Zellen mit einem kurzen ersten Zellzyklus fehlt dieser Aberrationstyp beinahe ganz. Es erhebt sich die Frage, ob die schwer geschädigten Zellen mit der langen Zellzyklusverzögerung inaktiviert oder eliminiert werden, bevor sie in die Mitose gelangen. Die Chromosomenaberrationen dieser Zell-

typen könnten nicht mehr erfasst werden. Die Chromatidaberrationen würden somit durch Selektion der wenigen strahlengeschädigten Zellen vermehrt auftreten. Man kann einwenden, dass die gefundenen, ähnlichen Häufigkeitsverteilungen der Aberrationen in allen Sammlungsfraktionen gegen diese Annahme sprechen. Interessanterweise beobachteten DEWEY und MILLER (1969) und BEDFORD et al. (1978) einige Chromatidaberrationen nach Bestrahlung von Zellen in der G_1-Phase. Dabei stellten DEWEY und MILLER fest, dass in Gegenwart von Colcemid die Chromatidaberrationen in der G_1-Phase induziert wurden. Anhand der vorliegenden Resultate wird vermutet, dass sich einige der Zellen mit einem langen ersten Zellzyklus während der Bestrahlung noch unter dem Einfluss des Colcemids befanden. Somit wären die Zellen trotz Synchronisation zum Zeitpunkt der Bestrahlung in unterschiedlichen Stadien der G_1-Phase.
Anderseits kann ein möglicher strahleninduzierter Enzymdefekt diese Aberrationen auslösen oder nicht restituieren. GATTI et al. (1979) fanden bei der Mutante mei 9 von Drosophila melanogaster mit einem Defekt im Replikations- und Excisions-Reparatur-System eine erhöhte Rate von Chromatidaberrationen in mitotischen Zellen.

4.2. Biologische Interpretation der negativen Binomialverteilung von Chromosomenaberrationen

Die beobachteten induzierten Chromosomenaberrationen werden als voneinander unabhängige stochastische Prozesse interpretiert, d.h. sie sind Folgen zufälliger Ereignisse. Vom Zeitpunkt der Schadensetzung bis zur Beurteilung des zytologischen Schadenbildes verstreicht eine geraume Zeit. Den empirisch gefundenen Verteilungen der Chromosomenaberrationen werden theoretische Verteilungen gegenübergestellt und oft auf kausale Zusammenhänge der intrazellulären Primärereignisse geschlossen. Vordergründig ist es von grossem zytologischem Interesse, die Häufigkeitsverteilungen von Zellen mit und ohne chromosomale Schäden zu be-

stimmen, doch bei der biologischen Interpretation des Primärschadens stösst man je nach der Art der Verteilung auf Schwierigkeiten. Die meisten Chromosomenaberrationen sind nach Poisson verteilt (LEA, 1946; GREENBLATT, 1961; SASAKI und NORMAN, 1966; LANGLANDS et al., 1968; HAAG und NIZZA, 197o; CARRANO, 1973 a; LUCHNIK et al., 1974). Auf der Poissonverteilung beruht auch die Treffertheorie von TIMOFÉEFF und ZIMMER (1947), die annahm, dass die Treffer der ionisierenden Strahlen im biologischen Material unabhängige Ereignisse darstellen. Ihre Weiterentwicklung führte zur kinetischen Theorie, die zusätzliche Aussagen über die Aenderungsgeschwindigkeit eines Systems unter Bestrahlung macht (HUG und KELLERER, 1966). Auch ihr liegt eine Poisson-Verteilung der Treffer im biologischen Treffbereich zugrunde, wobei der hypothetische Treffbereich zytologisch nicht zu identifizieren ist. DATTA et al. (1976) vermuteten nach Bestrahlung von CHO-Zellen mit α-Partikel von unterschiedlicher Reichweite, dass der kritische Treffbereich in der Nähe der Kernmembran liege.

Legt man das Modell von CHADWICK und LEENHOUTS (1974) zugrunde, wonach die strahleninduzierte, kritische molekulare Läsion ein DNA-Doppelstrangbruch sei,der zur Chromosomenaberration führen kann, so müssen die unterschiedlichen Längen der einzelnen Chromosomen berücksichtigt werden. Besitzt jedes Chromosom auf Grund seiner unterschiedlichen Länge eine eigene Wahrscheinlichkeit, von ionisierenden Strahlen "getroffen" zu werden, so müsste jedes Chromosom eine eigene Poisson-Verteilung für die Anzahl Schädigungen haben. Verschiedene Poisson-Verteilungen führen unter bestimmten statistischen Bedingungen zu einer negativen Binomialverteilung (BLISS und FISHER, 1953). Einer negativen Binomialverteilung entsprechend, stellt die beobachtete Häufigkeitsverteilung der Aberrationen in den Zellen das Resultat einer langen Reihe von Uebergangswahrscheinlichkeiten vom gesetzten Strahlenschaden über die Reparatur und anderen biologischen Variabilitäten bis zur Beobachtung dar.

Einige frühere Autoren konnten die Häufigkeiten von Chromoso-

menaberrationen ebenfalls nicht mit einer Poisson-Verteilung in Verbindung setzen (JACKSON und BARBER, 1958; OBE, 1969; SAVAGE, 197o; GNANAPURANI et al., 1972; EDWARDS et al., 1979). EDWARDS et al. errechneten Ueberdispersion von azentrischen Aberrationen in menschlichen Lymphozyten nach 3oo rad Röntgen- oder ^{60}Co-Strahlen. Ueberdispersion könnte nach SAVAGE (197o) und EDWARDS et al. (1979) auf eine beträchtliche Heterogenität der Zellpopulation zurückzuführen sein. Die bereits früher diskutierten beobachteten Chromatidaberrationen in Zellen mit einem langen Zellzyklus geben einen Hinweis auf eine heterogene Zellpopulation während der Bestrahlung.

SAVAGE postulierte für die "Zwei-Ereignis"-Aberrationen eine "site" Hypothese, die besagt, dass diese Aberrationstypen nur an bestimmten Stellen in den Chromosomen ("sites") auftreten. Die Anzahl "sites" würde bei einer NBV stochastisch von Zellkern zu Zellkern variieren.

Unter Anwendung der Warteschlangen-Theorie wurde von KOEHLER et al. (1976) und YAKOVENKO et al. (1976) ein Modell entwickelt, das geeignet ist, die Prozesse der Wechselwirkung zwischen dem Mutagen und den Chromosomen zu beschreiben und die Uebereinstimmung der tatsächlichen Verteilung der Brüche in den einzelnen Zellen mit der negativen Binomialverteilung zu erklären.

Im Modell M/M/1 aus der Warteschlangen-Theorie stehen Personen zu unterschiedlichen Zeiten an einem Schalter an um bedient zu werden. Die pro Zeitintervall eintreffenden Personen sind nach Poisson verteilt. Die Abfertigung am Schalter geschieht individuell und ist unabhängig von der Länge der Schlange. Werden gleichzeitig mehrere Schalter mit individuellen Abfertigungszeiten betrachtet, so folgen die Längen der Warteschlangen aller Schalter im stationären Zustand einer NBV. Im Modell für die Wechselwirkung von Mutagen und Chromosomen tritt anstelle des Schalters der Restitutionsvorgang. Die Restitution von potentiellen Chromosomenaberrationen würde zufällig erfolgen, die Restitutionszeiten wären unabhängig voneinander und von der Zeit der induzierten potentiellen Chromosomenaberrationen. Die War-

teschlange entspräche der Anzahl zufällig gesetzter Schäden minus den restituierten Schäden.
Nicht berücksichtigt im Modell wird die Lage der primären Schäden, der physiologische Zustand der Chromosomen, die zeitliche und örtliche Energieverteilung der ionisierenden Strahlung und der unterschiedliche Energiehaushalt der Zellen.
Für die Aberrationsinduktion und für die Restitution schlugen KOEHLER et al. einen Schätzwert (r) vor, der das Verhältnis von Restitution und Induktion chromosomaler Aberrationen angibt ($r = \frac{1+pi}{pi}$, wobei pi der geschätzte Parameter der negativen Binomialverteilung ist). Der Schätzwert (r), in Abb. 12 eingetragen, kann eine qualitative und relative Aussage bezüglich der Restitutionszeit im Verhältnis zur Zeit der Aberrationsinduktion geben. Ein grosses (r) würde bedeuten, dass chromosomale Schäden in einer bestimmten Zeit schnell restituiert werden, d.h. man würde wenig Chromosomenaberrationen erwarten. (r) korreliert jedoch nicht durchgehend mit den vorgefundenen Raten der Chromosomenaberrationen oder mit dem Anteil Zellen ohne Aberrationen. Ausnahmen bilden die Daten der letzten Sammlungsfraktionen 24-26 h und 26-28 h.Hingegen stimmen die prozentualen Anteile von Zellen mit der Fähigkeit zur Makrokoloniebildung gut mit (r) überein, d.h. mit abnehmendem (r) nimmt die Ueberlebenswahrscheinlichkeit ab. Es wird ein modifiziertes und erweitertes Modell vorgeschlagen, worin nicht nur chromosomale Läsionen, sondern auch Enzym- und/oder Membranschäden restituiert werden. Bei niedrigem (r) könnten trotz des Rückgangs sichtbarer Aberrationen zytologisch nicht feststellbare Schäden persistieren

4.3. Zellüberleben

Es ist eine allgemeine Tatsache, dass die Chromosomen- und Chromatidfragmente, die in der Mitose nicht auf die Tochterkerne verteilt werden, Mikrokerne in der folgenden Interphase bilden (MCLEISH, 1954; DAS, 1962; SCHMID, 1975; 1976). Die in der

vorliegenden Untersuchung oft auftretenden Mikrokerne in den Kontrollexperimenten sind bei bestrahlten Zellen in ähnlichem Umfang vorhanden. Es gibt keine Anhaltspunkte, dass die beobachteten Häufigkeiten von Makrokolonien mit den entsprechenden Mikrokernen pro Klon aus unbestrahlten und bestrahlten Stammzellen inhomogen sind, obwohl die Aberrationsrate bei den bestrahlten Zellen deütlich höher liegt. Die Diskrepanz zwischen den ursprünglich induzierten, vielen Chromosomenaberrationen und den später beobachteten, wenigen Mikrokernen in den Zellkolonien lässt sich dadurch erklären, dass viele mikrokerntragende Zellen durch Tod eliminiert werden. Beim Nichtverteilen von strahleninduzierten Chromosomenfragmenten auf die Tochterzellen in der Anaphase und der anschliessenden Mikrokernbildung erleiden beide Nachkommen einen genetischen Stückverlust, der zum Zelltod oder zur Inaktivierung führen kann. GROTE (1972) beurteilte in Lebendbeobachtungen die durch Röntgenstrahlen induzierten mikrokernenthaltenden Zellen des Syrischen Hamsters in vitro auf deren Proliferationsfähigkeit. Dabei bildeten Zellen mit Mikrokernen abortive oder langsam wachsende Kolonien.

Die aus bestrahlten Zellen hervorgegangenen Makrokolonien weisen signifikant weniger Mitosen pro Klon auf als die aus unbestrahlten Zellen hervorgegangenen Makrokolonien. Der Unterschied kann auf eine strahleninduzierte Verlangsamung des Zellzyklus oder auf eine Mosaikbildung zurückzuführen sein. Für die zweite Annahme müssten bestimmte Bezirke der nach Bestrahlung entstandenen Klone ihre Proliferationsfähigkeit verloren haben. Anhaltspunkte dafür liefern die festgestellten beträchtlichen Grössenunterschiede der Zellkolonien aus bestrahlten und unbestrahlten Zellen mit denselben Mitosenhäufigkeiten. HAEFNER (1966) und FRITZ-NIGGLI und BLATTMANN (1969) stellten nach UV- und Röntgenbestrahlung fest, dass Kolonien mit vitalen und letalen Zellen, sog. Mosaike, entstehen.

Der Anteil bestrahlter Zellen mit der Fähigkeit zur Mikrokoloniebildung bleibt über alle Sammlungsintervalle konstant, während der Anteil bestrahlter Zellen mit der Fähigkeit zur Makrokolonie-

bildung mit zunehmender Zellzyklusdauer abnimmt. Es erhebt sich die Frage, ob verschiedene Schädigungsmechanismen für inaktive oder langsam proliferierende Zellen und für Zelltod, d.h. Nicht-Koloniebildung, vorhanden sind. Für das Zellüberleben und für die Mitoseverzögerung ist nach SCAIFE (197o) nicht der gleiche primäre Schaden verantwortlich. Anhand seiner Untersuchungen an menschlichen Nierenzellen (Linie T) nach Röntgenbestrahlung folgert er, dass für die Mitoseverzögerung ein DNA-Schaden keine grosse Rolle spielt. Ein weiteres Indiz für mögliche unterschiedliche Mechanismen, die zum Zelltod oder zur Mikrokoloniebildung führen, liefern WESTRA und BARENDSEN (1966). Isolierte Zellen der T-1 Linie von Mikrokolonien zeigten über 35 Tage nach der Bestrahlung eine irreversible Verlangsamung des Zellzyklus gegenüber Zellen von Makrokolonien. Auch SINCLAIR (1964) nimmt zwei verschiedene Treffbereiche in der Zelle für den Letalitätsschaden und für den in Koloniegrössen ausgedrückten Schaden an. Anderseits weisen einige Autoren darauf hin (WESTRA und BARENDSEN, 1966; TREMP et al., 1979), dass die RBW-Werte (= Relative Biologische Wirksamkeit) für Zellen nach verschiedenen Dosen von α-Strahlen oder Pionen und Röntgenstrahlen bezüglich der Häufigkeiten von Makro- und Mikrokolonien ähnlich sind.

4.4. Die Rolle von Chromosomenaberrationen für den Zelltod

Für die beobachtete Nicht-Koloniebildung in der vorliegenden Untersuchung kann ein verzögerter Zelltod als Ursache angenommen werden, d.h. die letal geschädigten Zellen vollenden mindestens die nach der Bestrahlung folgende Mitose. Dass Säugetierzellen nach Bestrahlung mit niedrigen Dosen in der G_1-Phase die erste Mitose vollenden können, wurde in zahlreichen früheren Untersuchungen nachgewiesen (TOLMACH, 1961; FROESE, 1966; HURWITZ und TOLMACH, 1969; THOMPSON und SUIT, 1969; TROTT, 1969; GROTE, 1972; CARRANO, 1973 a; HAGEMANN, 1976).
Zwei Probleme sollen im folgenden diskutiert werden: 1. Sind die mit 3oo rad induzierten Chromosomenaberrationen hauptverantwort-

lich für den Zelltod ? 2. Welche andere Möglichkeiten sind in Betracht zu ziehen ?

1. Die Anteile von Zellen ohne Aberrationen aus den 2-stündigen Sammlungsfraktionen 16-24 h korrelieren mit der beobachteten Anzahl von Makrokolonien (Abb. 12). Folglich ist anzunehmen, dass vorwiegend Zellen mit Chromosomenschäden den Zelltod erleiden. Dabei können ein Verlust von Chromosomenfragmenten oder die Bildung von Anaphasenbrücken als Folge von "Zwei-Ereignis"-Aberrationen zu nicht-lebensfähigen Nachkommen führen. Die Chromosomenfragmente üben quantitativ einen grösseren Einfluss auf den Zelltod aus als die "Zwei-Ereignis"-Aberrationen, d.h. Zelltod wäre vorwiegend auf den Verlust von genetischem Material zurückzuführen.

Diese Befunde stehen in Einklang mit früheren Beobachtungen von LLOYD et al. (1976) und BEDFORD et al. (1978). LLOYD et al fanden nach Neutronenbestrahlung von menschlichen Lymphozyten ähnliche Dosiseffektkurven für Zellen ohne Aberrationen und für die Makrokoloniebildung. Danach dürfen nicht nur quantitativ die Raten der Chromosomenaberrationen mit der Nicht-Koloniebildung verglichen, sondern die Zelle selbst mit ihrem Schädigungsgrad muss berücksichtigt werden.

DEWEY et al. (1971) errechneten eine Ueberlebensrate von 37% bei durchschnittlich einer Chromosomenaberration pro Zelle. Aehnliche Werte findet man in der vorliegenden Untersuchung beim Vergleich von Aberrationsraten mit den entsprechenden absoluten Ueberlebensraten, z.B. liegt für die Sammlungsfraktion 2o-22 h die Aberrationsrate bei 1.o und die absolute Ueberlebensrate bei 44.8 $\pm$ 4.6 %. Die Ueberlebensraten verschieben sich jedoch bei der Korrektur der absoluten Prozentwerte um die als 1oo% festgelegte Kontrolle.

2. Die Zellen der letzten Sammlungsfraktion (24-26 h) besitzen eine deutlich geringere Fähigkeit zur Bildung von Makrokolonien als die vorhergehenden, obwohl der Anteil Zellen ohne Aberrationen zunimmt. Quantitativ ist der Einfluss dieser Zellen auf die Gesamtpopulation von beobachteten mitotischen Zellen gering, be-

trägt doch der prozentuale Anteil mitotischer Zellen für diese Sammlungsfraktion nur 2.4%, während für die ganze Versuchsreihe von 16-26 h der Anteil bei ca. 24% liegt. Möglicherweise spielen hier andere Faktoren als die Chromosomenaberrationen eine zusätzliche Rolle für den Zelltod.
FRITZ-NIGGLI (1968) postulierte einen engen Zusammenhang zwischen Reparatursystemen und der Strahlenempfindlichkeit. Ein zytoplasmatischer Defekt, z.B. in den Mitochondrien, würde demnach die membranabhängigen Reparatursysteme besonders treffen. BAISCH und BLUM (1978) konnten eine Aenderung des Membranpotentials bei L-929 Zellen der Maus nach Bestrahlung mit 55o rad Röntgenstrahlen messen.
Anderseits können intragenische, sublichtmikroskopische Mutationen vorhanden sein, die sich isoliert von den Chromosomenaberrationen manifestieren. COX et al. (1977) beschrieben eine relative Aehnlichkeit für die Mutationsinduktion und Zellinaktivierung nach Röntgen- und γ-Bestrahlung von Zellen des Chinesischen Hamsters und von menschlichen Zellen.

L I T E R A T U R

Barendsen, G.W.: The effectiveness of small doses of ionizing radiations for the induction of cell reproductive death, chromosomal changes and malignant transformation. In "Proc. 5th Symp. Microdosimetry" EUR 5452 (Ed. by Booz, J.; Ebert, H.G. and Smith, B.G.R.), 557-569 (1975).

Barendsen, G.W.: Influence of radiation quality on the effectiveness of small doses for induction of reproductive death and chromosome aberrations in mammalian cells. Int. Journ. Radiat. Biol. 36, 49-63 (1979).

Baisch, H.; Bluhm, H.: Effects of X-rays on cell membranes I. Changes of membrane potential of L-cells. Rad. and Environm. Biophys. 15, 213-219 (1978).

Blattmann, H.: Strahlenbiologische Experimente mit schweren Ionen. Dissertation, ETH Zürich (1974).

Bliss, C.I.; Fisher, R.A.: Fitting the negative binominal distribution to biological data. Biometrics 9, 176-196 (1953).

Bedford, J.S.; Mitchell, J.B.; Griggs, H.G.; Bender, M.A.: Radiation-induced cellular reproductive death and chromosome aberrations.Radiat. Res. 76, 573-586 (1978).

Bender, M.A.; Wolff, S.: X-ray induced chromosome aberrations and reproductive death in mammalian cells. Am. Nat. 95, 39-52 (1961).

Bender, M.A.; Brewen, J.G.: Factors influencing chromosome aberration yields in the human peripheral leukocyte system. Mut. Res. 8, 383-399 (1969).

Carrano, A.V.: The relation between chromosomal aberrations and radiation induced cellular lethality. Dissertation, University of California, Berkeley (1972).

Carrano, A.V.: Chromosome aberrations and radiation-induced cell death. I. Transmission and survival parameters of aberrations. Mut. Res. 17, 341-353 (1973 a).

Carrano, A.V.: Chromosome aberrations and radiation-induced cell death. II. Predicted and observed cell survival. Mut. Res. 17, 355-366 (1973 b).

Carrano, A.V.; Heddle, J.A.: The fate of chromosome aberrations. Journ. Theoret. Biol. 38, 289-304 (1973).

Chadwick, K.H.; Leenhouts, H.P.: Chromosome aberrations and cell death. In "Fourth Symposium on Microdosimetry" 1973 (Ed. by Booz, J.; Ebert, H.G.; Eickel, R. and Waker, A.), EUR 5122 Vol. 1, 585-599 (1974).

Comings, D.E.: What is a chromosome break? In "Chromosomes and Cancer" (Ed. by German, J.) 96-133, Wiley-Verlag, New York (1974).

Cox, R.; Thacker, J.; Goodhead, D.T.: Inactivation and mutation of cultured mammalian cells by aluminium characteristic ultrasoft X-rays. II. Dose responses of Chinese hamster and human diploid cells to aluminium X-rays and radiations of different LET. Int. Journ. Radiat. Biol. 31, 561-576 (1977).

Das, K.N.: Synthetic capacities of chromosome fragments correlated with their ability to maintain nucleolar material. Journ. Cell Biol. 15, 121-130 (1962).

Datta, R.; Cole, A.; Robinson, S.: Use of track-end alpha particles from ^{241}Am to study radiosensitive sites in CHO cells. Radiat. Res. 65, 139-151, (1976).

Dewey, W.C.; Miller, H.H.; Leeper, D.B.: Chromosomal aberrations and mortality of X-irradiated mammalian cells: Emphasis on repair. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 68, 667-671 (1971).

Edwards, A.A.; Lloyd, D.C.; Purrot, R.J.: Radiation induced chromosome aberrations and the Poisson distribution. Rad. and Environm. Biophys. 16, 89-100 (1979).

Fritz-Niggli, H.: Die Bedeutung des Repairsystems für die relative biologische Wirksamkeit von Strahlen verschiedener Qualität; eine Zwei-System-Theorie. Strahlentherapie 135, 202-212 (1968).

Fritz-Niggli, H.; Blattmann, H.: Verschiedene Mechanismen der Strahlen-Inaktivierung in Abhängigkeit von der Dosis und physiologischen Parametern. Biophysik 6, 46-62 (1969).

Froese, G.: Division delay in HeLa cells and Chinese hamster cells. A time-lapse study. Int. Journ. Radiat. Biol. 10, 353-367 (1966).

Gatti, M.: Genetic control of chromosome breakage and rejoining in Drosophila melanogaster: Spontaneous chromosome aberrations in X-linked mutants defective in DNA metabolism. Proc. Natl. Acad. Sci. (USA) 76, 1377-1381 (1979).

Gnanapurani, M.; Raju, M.R.; Richmann, C.; Wolff, S.: Chromatid aberrations induced by Pi-mesons in Vicia faba root meristem cells. Int. Journ. Radiat. Biol. 21, 49-56 (1972).

Greenblatt, CH.L.: The evaluation of X-ray-induced chromosome aberrations in cell-cultures of the Chinese hamster. Int. Journ. Radiat. Biol. 4, 185-210 (1961).

Grote, S.J.: Radiation-induced genetic damage and lethality in mammalian cells. Dissertation, University of London (1972).

Haag, J.; Nizza, P.: Dosimétrie chromosomique sur les lymphocytes de porc irradiés "in vitro" par le ^{60}Cobalt. Annales Génét. 13, 87-89 (1970).

Haefner, K.: Dose-dependence of the segregation pattern of U.V.-induced lethality in pedigrees derived from phased Schizosaccharomyces pombe. Photochem. and Photobiol. 5, 587-590 (1966).

Hagemann, G.: Reproduktivtod und Populationskinetik überlebender Hamsterzellen in vitro während 48 Stunden nach Röntgenstrahlendosen bis 800 rad. Strahlentherapie 151, 118-131 (1976).

Hahn, G.M.; Bagshaw, M.A.: Serum concentration: Effects on cycle and X-ray sensitivity of mammalian cells. Science 151, 459-461 (1966).

Heddle, J.A.; Carrano, A.V.: The DNA content of micronuclei induced in mouse bone marrow by γ-irradiation: Evidence that micronuclei arise from acentric chromosomal fragments. Mut. Res. 44, 63-69 (1977).

Hsu, T.C.; Dewey, W.C.; Humphrey, R.M.:Radiosensitivity of cells in Chinese hamster in vitro in relation to the cell cycle. Exptl. Cell Res. 27, 441-452 (1962).

Hug, O.; Kellerer, A.M.: Stochastik der Strahlenwirkung. Springer Verlag (1966).

Hurwitz, C.; Tolmach, L.J.: Time-lapse cinemicrographic studies of X-irradiated HeLa S3 cells. I. Cell progression and cell distintegration. Biophys. Journ. 9, 607-633 (1969).

Jackson, W.D.; Barber, H.N.: Patterns of chromosome breakage after irradiation and ageing. Heredity 12, 1-25 (1958).

Jonckheere, A.R.: A distribution-free k-sample test against ordered alternatives. Biometrika 41, 133-145 (1954).

Koehler, W.; Loeschke, V.; Obe,G.: Analysis of intercellular distributions of chromatid aberrations. Mut. Res. 34, 427-436 (1976).

Langlands, A.O.; Smith, P.G.; Buckton, K.E.; Woodcock, G.E.: Chromosome damage induced by radiation. Nature 218, 1133-1135 (1968).

Lea, D.E.: Actions of radiations on living cells. cambridge University Press (1946).

Lloyd, D.C.; Purrot, R.J.; Dolphin, G.W.; Bolton, D.; Edwards, A.A.; Corps, M.J.: The relationship between chromosome aberrations and low LET radiation dose to human lymphocytes. Int. Journ. Radiat. Biol. 28, 75-90 (1975).

Lloyd, D.C.; Purrot, R.J.; Dolphin, G.W.; Edwards, A.A.: Chromosome aberrations induced in human lymphocytes by neutron irradiation. Int. Journ. Radiat. Biol. 29, 169-182 (1976).

Luchnik, N.V.; Morozov, K.N.; Ovchinnikova, V.G.; Fesenko, E.V.: Types and frequencies of chromosomal aberrations induced by irradiation of different parts of interphase in Crepis capillaris. Mut. Res. 24, 293-306 (1974).

McLeish, J.: The consequences of localised chromosome breakage. Heredity 8, 385-407 (1954).

Mauersberger, B.: Aktuelle Probleme der Zellzüchtung. Gustav Fischer Verlag, Jena (1971).

Obe, G.: Die interzelluläre Verteilung chemisch induzierter Chromatidbrüche und -Translokationen bei menschlichen Leukozyten in vitro. Z. Naturforschg. 24b,1207-1208 (1969).

Pain, R.H.; Smith, B.J.: Comparison of Mycoplasma screening techniques. In "New Techniques in Biophysics and Cell Biology" (Ed. by Pain, R.H. and Smith, B.J.), Vol 1, 263, Wiley-Interscience New York (1973).

Prescott, D.M.; Bender, M.A.: Synthesis of RNA and protein during mitosis in mammalian tissue culture cells. Exptl. Cell Res. 26, 260-268 (1962).

Puck, T.T.; Marcus, P.I.: Action of X-rays on mammalian cells. Journ. exp. Med. 103, 653-666 (1956).

Puck, T.T.: Action of radiation on mammalian cells. III. Relationship between reproductive death and induction of chromosome anomalies by X-irradiation of euploid human cells in vitro. Proc. Natl. Acad. Sci (USA) 44, 772-780 (1958).

Revell, S.H.: The breakage-andreunion theory and the exchange theory for chromosomal aberrations induced by ionizing radiations: A short history. Advances in Radiat. Biol. 4, 367-416 (1974).

Rohmsdahl, M.M.: Synchronisation of human cell lines with Colcemid. Exptl. Cell Res. 50, 463-467 (1968).

Sasaki, M.S.; Norman, A.: Proliferation of human lymphocytes in culture. Nature 210, 913-914 (1966).

Savage, J.R.K.: Sites of radiation induced chromosome exchanges. Current topics in radiation research 6, 131-194 (1970).

Savage, J.R.K.: Classification and relationship of induced chromosomal structural changes. Journ. Med. Gen. 13, 103-122 (1976).

Scaife, J.F.: Mitotic G_2 delay induced in synchronized human kidney cells by UV- and X-irradiation and its relation to DNA strand breakage, repair and transcription. Cell tissue kinet. 3, 229-242 (1970).

Schindler, R.:Recent results in cancer research. Springer Verlag (1965).

Schmid, W.: The micronucleus test.Mut. Res. 31, 9-15 (1975).

Schmid, W.: The micronucleus test for cytogenetic analysis. In "Chemical Mutagens principles and methods for their detection" (Ed. by Hollaender, A.), 31-53, Plenum Press (1976).

Schwarzacher, H.G.: Präparation von Mitose-Chromosomen. In "Methoden in der medizinischen Cytogenetik" (Ed. by Schwarzacher, H.G. and Wolf, U.), 55-66, Springer Verlag (1970).

Scott, D.; Fox, M.; Fox, B.W.: The relationship between chromosomal aberrations, survival and DNA repair in tumour cell lines of differential sensitivity to X-rays and sulphur mustard. Mut. Res. 22, 207-221 (1974).

Sinclair, W.K.: X-ray-induced heritable damage (small-colony formation) in cultured mammalian cells. Radiat. Res. 21, 584-611 (1964).

Sinclair, W.K.: Cyclic X-rays responses in mammalian cells in vitro. Radiat. Res. 33, 620-643 (1968).

Skarsgard, L.D.: In "The radiobiology of cultured mammalian cells" (Ed. by Elkind, M.M. and Whitmore, G.F.), 420-421, Gordon and Breach, New York (1967).

Stubblefield, E.: DNA-synthesis and chromosomal morphology of Chinese hamster cells cultured in media containing colcemid. In "Cytogenetics of Cells in Culture" (Ed. by Harris, R.J.C.), 223-248, Academic Press, New York (1964).

Stubblefield, E.; Klevecz, R. ; Deaven, L.: Synchronized mammalian cell culture: I. Cell replication cycle and macromolecular synthesis following brief colcemid arrest of mitosis. Journ. Cell Physiol. 69, 345-354 (1967).

Stubblefield, E.: Synchronization methods for mammalian cell cultures. In "Methods in Cell Physiology" (Ed. by Prescott, D.) Vol. III, 28-41, Academic Press, New York (1968).

Taylor, E.W.: The mechanism of colchicine inhibition of mitosis: I. Kinetics of inhibition and the binding of ^{3}H-colchicine. Journ. Cell biol. 25, 145-160 (1965).

Terasima, T.; Tolmach, L.J.: Growth and nucleic acid synthesis in synchronously dividing populations of HeLa cells. Exptl. Cell Res. 30, 344-362 (1963).

Thiessen, G.: Analysis of irradiated tissue culture cells. Progress in Histochemistry and Cytochemistry 4, 91-189 (1972).

Thompson, L.H.; Suit, H.D.: Proliferation kinetics of X-irradiated mouse L cells studied with time-lapse photography. Int. Journ. Radiat. Biol. 15, 347-362 (1969).

Timoféeff-Ressovsky, N.W.; Zimmer, K.G.: Das Trefferprinzip in der Biologie. Biophysik Bd. 1, Hirzel-Verlag, Leipzig (1947).

Töllner, D.; Hagemann, G.; Stender, H.St.: Der Einfluss ionisierender Strahlen auf die Koloniegrössenverteilung von CHO-Fibroblasten. Strahlentherapie 145, 604-611 (1973).

Tolmach, L.J.: Growth patterns of X-irradiated HeLa cells. Ann. N.Y. Acad. Sci. 95, 743-757 (1961).

Tremp, J.; Blattmann, H.; Fritz-Niggli,H.: Cell survival over the depth profile after irradiation with a negative pion beam. Rad. and Environm. Biophys. 16, 267-272 (1979).

Trott, K.R.: Strahlenwirkungen auf die Vermehrung von Säugetierzellen. In "Handbuch der medizinischen Radiologie" (Ed. by Diethelm, L.), 43-125 (1972).

Westra, A.; Barendsen, G.W.: Proliferation characteristics of cultured mammalian cells after irradiation with sparseley and densely ionizing radiations. Int. Journ. Radiat. Biol. 11, 477-485 (1966).

Whitmore, G.F.; Gulyas, S.; Botond, J.: Radiation sensitivity throughout the cell cycle and its relationship to recovery. In "Cellular Radiation Biology", 423-441, Williams and Wilkins, Baltimore (1965).

Wolff, S.: The kinetics for two-break chromosome exchanges. Journ. Theoret. Biol. 3, 304-314 (1962).

Wolff, S.: Chromosome aberrations and the cell cycle. Radiat. Res. 33, 609-619 (1968).

Yakovenko, K.N.; Bochkov, N.P.; Chebotarev, A.N.: The distribution of chemically induced chromosome breaks in human cells. Biol. Zbl. 95, 437-450 (1976).

Yu, C.K.; Sinclair, W.K.: Mitotic delay and chromosomal aberrations induced by X-rays in synchronized Chinese hamster cells in vitro. Journ. Natl. Cancer Inst. 39, 619-631 (1967).

T A B E L L E N und A B B I L D U N G E N

Tabelle 1 Chromosomenaberrationen in der ersten Mitose nach Bestrahlung mit 3oo rad in der frühen G_1-Phase. Eingetragen sind mit $\bar{x}$ die Mittelwerte, $s_{\bar{x}}$ der mittlere Fehler der Mittelwerte, berechnet aus den relativen Häufigkeiten.

Sammlungszeit der mitotischen Zellen	Mitosenindex		Anzahl beurteilter Metaphasen	Total Anzahl Aberrationen	Aberrationen/ Zelle		"Zwei Ereignis" Aberrationen/ Zelle	Chromatidaberrationen/Zelle	Chromosomale Deletionen/ Zelle	
	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$			$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$
16-18 h 3oo rad	3.4±	o.9	199	165	o.83±	o.o7	o.o15	o.o5	o.75±	o.o7
Kontrolle	3.6±	o.6	1o5		o.o9		o.oo	o.o2	o.o7	
18-2o h 3oo rad	6.7±	o.5	311	311	1.oo±	o.o7	o.o57	o.o7	o.82±	o.o6
Kontrolle	7.0±	o.4	11o		o.19*		o.o1	o.o5	o.12	
2o-22 h 3oo rad	6.4±	o.9	388	388	1.oo±	o.o6	o.o51	o.o5	o.85±	o.o5
Kontrolle	6.6±	o.3	1o2		o.19*		o.oo	o.o6	o.13	
22-24 h 3oo rad	4.5±	o.8	312	368	1.18±	o.o8	o.o84	o.o8	o.93±	o.o6
Kontrolle	5.2±	o.9	1o5		o.11		o.oo	o.o4	o.o7	
24-26 h 3oo rad	2.4±	o.4	377	354	o.94±	o.o6	o.o4	o.11	o.75±	o.o5
Kontrolle	1.5±	o.2	98		o.11		o.oo	o.o1	o.1o	
26-28 h 3oo rad	1.8±	o.6	339	298	o.88±	o.o7	o.o32	o.12	o.69±	o.o5
Kontrolle	o.9±	o.4	1oo		o.o7		o.oo	o.o1	o.o6	
Rate der Chromosomenaberrationen für alle in der G_1 bestrahlte Zellen, gewichtet mit dem Mitoseindex und nach Abzug der Kontrolle					o.85		o.o5		o.72	

* Diese hohe Spontanrate ist dadurch zu erklären, dass 2 Zellen je 4 Aberrationen aufwiesen.

Tabelle 2 Chi-Quadrat Test auf Homogenität der Häufigkeiten von n-Aberrationen pro Zelle in den einzelnen Versuchen.

Sammlungsintervall 16-18 h

Anzahl Versuche	n-Aberrationen pro Zelle				Total
	o	1	2	3-n	
1	28	14	6	3	51
2	2o	21	4	4	49
3	32	19	1o	4	65
4	13	12	6	3	34
Total	93	66	26	14	199

$\hat{\chi}^2 = 6.14 < 16.92 = \chi^2_{9;o.o5}$

Sammlungsintervall 18-2o h

Anzahl Versuche	n-Aberrationen pro Zelle					Total
	o	1	2	3	4-n	
1	47	27	17	4	6	1o1
2	3o	18	8	3	3	62
3	24	14	7	7	1	53
4	39	28	15	1o	3	95
Total	14o	87	47	24	13	311

$\hat{\chi}^2 = 8.57 < 21.o3 = \chi^2_{12;o.o5}$

Sammlungsintervall 2o-22 h

Anzahl Versuche	n-Aberrationen pro Zelle					Total
	o	1	2	3	4-n	
1	36	22	11	8	4	81
2	29	41	8	7	7	92
3	54	27	12	3	5	1o1
4	29	2o	19	4	3	75
5	16	14	5	4	o	39
Total	164	124	55	26	19	388

$\hat{\chi}^2 = 29.48 < 32.o = \chi^2_{16;o.o1}$

Sammlungsintervall 22-24 h

Anzahl Versuche	n-Aberrationen pro Zelle					Total
	o	1	2	3	4-n	
1	48	29	18	5	1o	11o
2	21	21	7	4	3	56
3	26	23	14	7	1	71
4	22	27	16	1	9	75
Total	117	1oo	55	17	23	312

$\hat{\chi}^2 = 17.82 < 21.o3 = \chi^2_{12;o.o5}$

Tabelle 2 (Fortsetzung)

Sammlungsintervall 24-26 h

Anzahl Versuche	n-Aberrationen pro Zelle o	1	2	3	4-n	Total
1	44	33	1o	1o	3	1oo
2	39	15	9	7	2	72
3	53	22	14	7	3	99
4	26	22	8	3	4	63
5	19	16	3	2	3	43
Total	181	1o8	44	29	15	377

$\hat{\chi}^2 = 14.45 < 26.3 = \chi^2_{16;0.05}$

Sammlungsintervall 26-28 h

Anzahl Versuche	n-Aberrationen pro Zelle o	1	2	3	4-n	Total
1	49	32	3	8	8	1oo
2	47	27	11	12	3	1oo
3	42	22	7	2	3	76
4	39	12	8	3	1	63
Total	177	93	29	25	15	339

$\hat{\chi}^2 = 20.43 < 21.03 = \chi^2_{12;0.05}$

Tabelle 3 Beobachtete und erwartete Häufigkeitsverteilungen von allen Chromosomenaberrationen in den Zellen nach Bestrahlung. Chi-Quadrat Test für die beobachteten und erwarteten Werte nach einer negativen Binomialverteilung: $P(n) = \binom{k+n-1}{n} \left(\frac{pi}{1+pi}\right)^n \left(\frac{1}{1+pi}\right)^k$, wobei pi und k geschätzte Parameter sind. p = Wahrscheinlichkeitswert für die Chi-Quadrat Anpassung der beobachteten an die errechneten Werte. $\bar{x}$ sind die Mittelwerte der Chromosomenaberrationen und s die Standardabweichungen, berechnet aus den relativen Häufigkeiten. D = Dispersionsindex : $\frac{s^2}{\bar{x}}$.

Sammlungszeit der mitotischen Zellen nach der Synchronisation	n-Aberrationen pro Zelle o	1	2	3	4	5	6	7	χ^2	FG	p	$\bar{x}$	s	D
16-18 h beobachtet	93	66	26	9	4	1	(5-n)		0.6o	3	o.8o	o.83	1.o1	1.22
erwartet	93.5	64.2	27.7	9.6	2.9	1.1								
18-2o h beobachtet	14o	87	47	24	9	3	1	(6-n)	1.64	4	o.8o	1.oo	1.19	1.19
erwartet	137.2	93.3	46.5	2o.4	8.3	3.3	1.9							
2o-22 h beobachtet	164	124	55	26	11	7	1	(6-n)	3.62	4	o.4o	1.oo	1.2o	1.2o
erwartet	165.1	119	6o.5	26.4	1o.6	4.o	2.3							
22-24 h beobachtet	117	1oo	55	17	15	5	2	1 (7-n)	4.76	5	o.4o	1.18	1.41	1.19
erwartet	12o.7	93.2	52.2	25.6	11.6	5.1	2.1	1.4						
24-26 h beobachtet	181	1o8	44	29	7	6	2	(6-n)	4.69	4	o.3o	o.94	1.21	1.29
erwartet	18o.7	1o6.3	51	22.6	9.6	4.o	2.7							
26-28 h beobachtet	177	93	29	25	8	5	2	(6-n)	6.74	4	o.1o	o.88	1.27	1.44
erwartet	178.1	86.4	4o.3	18.6	8.5	3.9	3.2							

Tabelle 4 Beobachtete und erwartete Häufigkeitsverteilungen von chromosomalen Deletionen in den Zellen nach Bestrahlung. Chi-Quadrat Test für die beobachteten und erwarteten Werte nach einer negativen Binomialverteilung: $P(n) = \binom{k+n-1}{n} \left(\frac{pi}{1+pi}\right)^n \left(\frac{1}{1+pi}\right)^k$, wobei pi und k geschätzte Parameter sind. p = Wahrscheinlichkeitswert für die Chi-Quadrat Anpassung der beobachteten an die errechneten Werte. $\bar{x}$ sind die Mittelwerte der chromosomalen Deletionen und s die Standardabweichungen, berechnet aus den relativen Häufigkeiten. D = Dispersionsindex : $\frac{s^2}{\bar{x}}$.

Sammlungszeit der mitotischen Zellen nach der Synchronisation	n-Aberrationen pro Zelle						χ^2	FG	p	$\bar{x}$	s	D
	o	1	2	3	4	5-n						
16-18 h beobachtet	1oo	66	21	8	3	1	1.o4	3	o.8o	o.75	o.96	1.28
erwartet	1o1.2	62	24.6	8	2.3	o.8						
18-2o h beobachtet	151	94	48	11	7	o	5.46	3	o.1o	o.82	o.97	1.18
erwartet	148.7	1oo.6	42.2	14	5.5	o.9						
2o-22 h beobachtet	178	125	54	2o	9	2	1.13	3	o.7o	o.85	1.o4	1.22
erwartet	177.7	124.5	56	2o.5	6.6	2.7						
22-24 h beobachtet	126	114	51	12	8	1	4.31	3	o.2o	o.93	1.oo	1.o8
erwartet	127.7	11o.1	51.3	17.1	4.6	1.3						
24-26 h beobachtet	2o3	1o7	43	15	8	1	2.43	3	o.4o	o.75	o.99	1.32
erwartet	2o2.2	1o8.5	43.4	15.4	5.1	2.4						
26-28 h beobachtet	191	91	34	17	4	2	1.38	3	o.7o	o.69	o.99	1.43
erwartet	19o.2	92.3	36.4	13.2	4.6	2.3						

Tabelle 5 Koloniebildungsfähigkeit bestrahlter und unbestrahlter Zellen. Die stetige Abnahme der beobachteten Anzahl Makrokolonien aus bestrahlten Zellen in den verschiedenen Sammlungsintervallen konnte mit dem nichtparametrischen Test auf Trend von Jonckheere (1954) mit einem $p < o.ol$ gesichert werden. Eingetragen sind mit $\bar{x}$ die Mittelwerte und $s_{\bar{x}}$ der mittlere Fehler der Mittelwerte, ebenso (*) die Anzahl beobachteter Fälle.

Sammlungsintervall in h	Anzahl beobachteter Zellpaare	Anzahl Versuche	Anzahl fraglich beurteilter Zellpaare	Anteil Zellen in % mit Makrokoloniebildung			Anteil Zellen in % mit Mikrokoloniebildung			Anteil Zellen in % ohne Proliferationsfähigkeit		
				$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	(*)	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	(*)	$\bar{x}$	$s_{\bar{x}}$	(*)
16-18 h 3oo rad	4o4	4	16	52.2±	5.5	(2o3)	21.5±	3.7	(83)	26 ±	2.8	(1o2)
Kontrolle	178	2	6	61.4±	3.4	(1o8)	14.7±	o.7	(26)	21.1±	1.4	(38)
18-2o h 3oo rad	4o6	4	18	45.o±	6.1	(173)	26.2±	2.4	(1o4)	28.o±	4.8	(112)
Kontrolle	2o6	2	7	65.5±	o.5	(131)	18.o±	1.2	(37)	15.o±	o.8	(31)
2o-22 h 3oo rad	5oo	5	17	44.8±	4.6	(217)	29.o±	2.2	(14o)	27.4±	3.o	(126)
Kontrolle	21o	2	18	62.5±	5.5	(121)	16.8±	2.7	(35)	17.3±	2.7	(36)
22-24 h 3oo rad	489	5	14	38.2±	2.7	(181)	29.2±	2.7	(138)	33.2±	2.1	(158)
Kontrolle	2oo	2	8	63.o±	2.o	(137)	18.2±	1.8	(38)	17.4±	1.6	(37)
24-26 h 3oo rad	497	5	23	33.4±	2.1	(158)	25.4±	1.8	(122)	41.o±	2.8	(194)
Kontrolle	212	2	12	64.o±	2.o	(131)	14.7±	1.9	(31)	17.5±	2.o	(37)

Tabelle 6 Häufigkeitsverteilungen der Zellkolonien für die unterschiedlichen Klassen I-IV der darin auftretenden Mikrokerne (horizontal) und für die Anzahl Mitosen (vertikal). Dabei bedeuten: Klasse I: Kolonien mit 2-9 Zellen pro Kolonie; Klasse II: Kolonien mit lo-29 Zellen pro Kolonie; Klasse III: Kolonien mit 3o-49 Zellen pro Kolonie; Klasse IV: Kolonien mit mehr als 5o Zellen pro Kolonie.

Sammlungsfraktion 16-18 h: mit 3oo rad bestrahlte Zellen

Anzahl Mitosen pro Kolonie	Anzahl Mikrokerne pro Kolonie o-2				3-5				≥6				Total Kolonien mit entsprechenden Mitosen/Kolonie			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
o-1	27	23	9	96	lo	5	4	35	2	5	1	lo	39	33	14	141=48.1%
2-3	-	-	-	31	-	-	-	7	-	-	-	-	-	-	-	38 =13.o%
4-n	-	-	-	24	-	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	28 = 9.6%
Total Kolonien mit entsprechenden Mikrokernen	27	23	9	151	lo	5	4	46	2	5	1	lo				
% aller Kolonien	9.2	7.8	3.o	51.5	3.4	1.7	1.4	15.7	o.7	1.7	o.3	3.4				

Sammlungsfraktion 18-2o h: mit 3oo rad bestrahlte Zellen

o-1	4o	35	12	1o7	2	7	4	23	-	-	4	4	42	42	2o	134=45.9%
2-3	-	-	-	23	-	-	-	4	-	-	-	2	-	-	-	29 = 9.9%
4-n	-	-	-	23	-	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	25 = 8.6%
Total	4o	35	12	153	2	7	4	29	-	-	4	6				
% aller Kolonien	13.7	12	4.1	52.4	o.7	2.3	1.4	9.9			1.4	2.o				

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Sammlungsfraktion 2o-22 h: mit 3oo rad bestrahlte Zellen

Anzahl Mitosen pro Kolonie	Anzahl Mikrokerne pro Kolonie												Total Kolonien mit entsprechenden Mitosen/Kolonie			
	o-2				3-5				≥6							
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
o-1	4o	29	21	96	8	8	3	24	-	5	2	6	48	42	26	126=39.6%
2-3	-	-	-	29	-	-	-	8	-	-	-	1	-	-	-	38 =11.9%
4-n	-	-	-	32	-	-	-	6	-	-	-	-	-	-	-	38 =11.9%
Total Kolonien mit entsprechenden Mikrokernen	4o	29	21	157	8	8	3	38	-	5	2	7				
% aller Kolonien	12.6	9.1	6.6	49.4	2.5	2.5	o.9	11.9		1.6	o.6	2.2				

Sammlungsfraktion 22-24 h: mit 3oo rad bestrahlte Zellen

o-1	53	33	19	83	8	5	5	18	-	-	3	6	61	38	27	1o7=36.o%
2-3	-	-	-	24	-	-	-	4	-	-	-	2	-	-	-	3o =1o.1%
4-n	-	-	-	29	-	-	-	4	-	-	-	1	-	-	-	34 =11.4%
Total	53	33	19	136	8	5	5	26	-	-	3	9				
% aller Kolonien	17.8	11.1	6.4	45.8	2.7	1.7	1.7	8.8			1.o	3.o				

Sammlungsfraktion 24-26 h: mit 3oo rad bestrahlte Zellen

o-1	44	31	21	91	2	6	1o	12	2	2	2	1o	48	39	33	113=4o.6%
2-3	-	-	-	22	-	-	-	2	-	-	-	1	-	-	-	25 = 9.o%
4-n	-	-	-	14	-	-	-	4	-	-	-	2	-	-	-	2o = 7.2%
Total	44	31	21	127	2	6	1o	18	2	2	2	13				
% aller Kolonien	15.5	11.2	7.6	45.7	o.7	2.2	3.6	6.5	o.7	o.7	o.7	4.7				

Tabelle 6 (Fortsetzung)

Kontrolle

Anzahl Mitosen pro Kolonie	Anzahl Mikrokerne pro Kolonie o-2				3-5				≥6				Total Kolonien mit entsprechenden Mitosen/Kolonie			
	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV	I	II	III	IV
o-1	7o	34	33	113	3	4	2	25	2	3	1	12	75	41	23	186=25.6%
2-3	-	-	2	76	-	-	-	1o	-	-	-	7	-	-	2	93 =13.9%
4-n	-	1	1	191	-	-	-	53	-	-	-	21	-	1	1	265=39.4%
Total	7o	35	23	416	3	4	2	88	2	3	1	4o				
% aller Kolonien	1o.2	5.1	3.3	6o.6	o.4	o.6	o.3	12.8	o.3	o.4	o.1	5.8				

Tabelle 7 Prüfung auf Homogenität der Häufigkeitsverteilungen der Zellkolonien aus bestrahlten Zellen mit den darin auftretenden Mikrokernen und mit der Anzahl Mitosen. Aufgetragen sind die Anzahl Mikro- und Makrokolonien.

1. Prüfung auf Homogenität der Makrokolonien mit der entsprechenden Anzahl Mitose/Kolonie

Sammlungszeit der Stammzellen	Anzahl Mitosen pro Kolonie			Total Kolonien
	o-1	2-3	≥4	
16-18 h	141	38	28	2o7
18-2o h	134	29	25	188
2o-22 h	126	38	38	2o2
22-24 h	1o7	3o	34	171
24-26 h	113	25	2o	158
Total Kolonien	621	16o	145	926

$\hat{\chi}^2 = 8.57 < 15.51 = \chi^2_{8;0.05}$

Es gibt keine Anhaltspunkte, dass die beobachteten Häufigkeiten inhomogen sind.

Chi-Quadrat Test auf Homogenität der Häufigkeiten von Makrokolonien aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen mit den entsprechenden Mitosen/Kolonie

Mitosen/Kolonie	bestrahlt	unbestrahlt	
o-1	621	186	8o7
2-3	16o	93	253
≥4	145	265	41o
	926	544	147o

$\hat{\chi}^2 = 201.7 > 5.99 = \chi^2_{2;0.05}$

Der Test legt nahe, dass Inhomogenität zwischen den Gruppen besteht

2. Prüfung auf Homogenität der Mikrokolonien mit o-1 Mitose/Kolonie

Sammlungszeit der Stammzellen	Mikrokolonienklassen			Total Kolonien
	I	II	III	
16-18 h	39	33	14	86
18-2o h	42	42	2o	1o4
2o-22 h	48	42	26	116
22-24 h	61	38	27	126
24-26 h	48	39	33	12o
Total Kolonien	238	194	12o	672

$\hat{\chi}^2 = 16.32 > 15.51 = \chi^2_{8;0.05}$

Der Test legt nahe, dass Inhomogenität zwischen den Gruppen besteht.

Chi-Quadrat Test auf Homogenität der Häufigkeiten von Mikrokolonien aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen mit o-1 Mitose pro Kolonie

Koloniеklasse	bestrahlt	unbestrahlt	
I	39	75	114
II	33	41	74
III	14	23	37
	86	139	225

Sammlungszeit 16-18 h

$\hat{\chi}^2 = 2.05 < 5.99 = \chi^2_{2;0.05}$

Tabelle 7 (Fortsetzung)

3. Prüfung auf Homogenität der Makrokolonien mit den entsprechenden Mikrokernen/Kolonie.

Sammlungszeit der Stammzellen	Anzahl Mikrokerne pro Kolonie o-2	3-5	≥6	Total Kolonien
16-18 h	151	46	1o	2o7
18-2o h	153	29	6	188
2o-22 h	157	38	7	2o2
22-24 h	136	26	9	171
24-26 h	127	18	13	151
Total Kolonien	724	157	45	926

$$\hat{\chi}^2 = 13.99 < 15.51 = \chi^2_{8;o.o5}$$

Es gibt keine Anhaltspunkte, dass die beobachteten Häufigkeiten inhomogen sind.

Chi-Quadrat Test auf Homogenität der Häufigkeiten von Makrokolonien aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen der entsprechenden Mikrokerne/Kolonie.

Mikrokerne/ Kolonie	bestrahlt	unbestrahlt	
o-2	724	416	114o
3-5	157	88	245
≥6	45	4o	85
	926	544	147o

$$\hat{\chi}^2 = 3.94 < 5.99 = \chi^2_{2;o.o5}$$

Es gibt keine Anhaltspunkte, dass die beobachteten Häufigkeiten inhomogen sind.

4. Prüfung auf Homogenität der Mikrokolonien (Kl. I-III) mit o-2 Mikrokernen/Kolonie.

Sammlungszeit der Stammzellen	Mikrokolonienklassen I	II	III	Total Kolonien
16-18 h	27	23	9	59
18-20 h	4o	35	12	87
2o-22 h	4o	29	21	9o
22-24 h	53	33	19	1o5
24-26 h	44	31	21	96
Total Kolonien	2o4	151	82	437

$$\hat{\chi}^2 = 5.23 < 15.51 = \chi^2_{8;o.o5}$$

Es gibt keine Anhaltspunkte, dass die beobachteten Häufigkeiten inhomogen sind.

Chi-Quadrat Test auf Homogenität der Häufigkeiten von Mikrokolonien aus unbestrahlten und bestrahlten Zellen mit o-2 Mikrokerne/Kolonie.

Kolonieklasse	bestrahlt	unbestrahlt	
I	2o4	7o	274
II	151	35	186
III	82	23	1o5
	437	128	565

$$\hat{\chi}^2 = 2.9 < 5.99 = \chi^2_{2;o.o5}$$

Es gibt keine Anhaltspunkte, dass die beobachteten Häufigkeiten inhomogen sind.

Tabelle 7 (Fortsetzung)

Kolonie-klasse	bestrahlt	unbestrahlt		
I	42	75	117	Sammlungszeit 18-2o h
II	42	41	83	
III	2o	23	43	
	1o4	139	243	

$\hat{\chi}^2 = 4.58 < 5.99 = \chi^2_{2;o.o5}$

I	48	75	123	Sammlungszeit 2o-22 h
II	42	41	83	
III	26	23	49	
	116	139	225	

$\hat{\chi}^2 = 3.6 < 5.99 = \chi^2_{2;o.o5}$

I	61	75	136	Sammlungszeit 22-24 h
II	38	41	79	
III	27	23	5o	
	126	139	265	

$\hat{\chi}^2 = 1.24 < 5.99 = \chi^2_{2;o.o5}$

I	48	75	123	Sammlungszeit 24-26 h
II	39	41	8o	
III	33	23	56	
	12o	139	259	

$\hat{\chi}^2 = 6.4 > 5.99 = \hat{\chi}^2_{2;o.o5}$

Mit Ausnahme der beobachteten Häufigkeiten von Mikrokolonien in der letzten Sammlungsfraktion gibt es keine Anhaltspunkte, dass die beobachteten Häufigkeiten inhomogen sind.

ABBILDUNGSLEGENDEN

Abb. 1 Zwei Makrokolonien von unbestrahlten Zellen des Chinesischen Hamsters.

Abb. 2 Mikrokolonie der Klasse III (30-49 Zellen/Kolonie). Als strahleninduzierte, morphologische Veränderungen sind Mikrokerne (←) und "Kernrosette" mit innerem Plasmaeinschluss (⟵) sichtbar.

Abb. 3 Mikrokolonie der Klasse II (lo-29 Zellen/Kolonie). Deutlich erkennbar sind vergrösserte, einkernige Zellen, sog. Riesenzellen (⟵).

Abb. 4 Schema des experimentellen Ablaufs der Zellklonierungsanalyse und der parallel dazu durchgeführten Bestimmung der Chromosomenaberrationen.

Abb. 5 Dosiseffektkurven für überlebende, makrokolonienbildende Zellen aus synchronen (o) in der frühen G_1-Phase und asynchronen (●) bestrahlten Zellpopulationen. Eingetragen sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler der Mittlerwerte.

Abb. 6 Verteilung der Koloniegrössen in Abhängigkeit von der Strahlendosis. Bestrahlt wurden die synchronen Zellen in der frühen G_1-Phase. Es bedeuten: Klasse I: Mikrokolonien mit 2-9 Zellen/Kolonie; Klasse II: Mikrokolonien mit lo-29 Zellen/Kolonie; Klasse III: Mikrokolonien mit 3o-49 Zellen/Kolonie; Klasse IV: Makrokolonien. Eingetragen sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler der Mittelwerte.

Abb. 7 Prozentuale Anteile der Zellen, die zu unterschiedlichen Zeiten nach der Synchronisation in die erste Mitose ge-

langten: (●·········) mitotische Zellen ohne vorhergehende Bestrahlung; (o—·—·—) mitotische Zellen mit vorhergehender Bestrahlung von 3oo rad in der frühen G_1-Phase. Eingetragen sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler der Mittelwerte.

Abb. 8 Rate der Chromosomenaberrationen für sechs zu unterschiedlichen Zeiten nach der Synchronisation in die erste Mitose gelangende Zellgruppen. Es wurde in der frühen G_1-Phase mit 3oo rad bestrahlt. Es bedeuten: ● alle Aberrationen; x chromosomale Deletionen; o "Zwei-Ereignis"-Aberrationen; + Chromatidaberrationen. Die gestrichelt eingetragenen Werte sind die mit den Mitosenindixes der einzelnen Sammlungsfraktionen gewichteten Raten der Aberrationen für alle Typen von Chromosomenaberrationen (o.85) und für chromosomale Deletionen (o.72). Die Kontrollwerte sind abgezogen. Eingetragen sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler der Mittelwerte, berechnet aus den relativen Häufigkeiten.

Abb. 9 Prozentuale Anteile klonaler Stammzellen in der auf die Bestrahlung folgenden Mitose ohne (o), mit einer (●) sowie mit zwei und mehreren (□) Aberrationen pro Zelle. Bestrahlt wurde mit 3oo rad in der frühen G_1-Phase. Eingetragen sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler der Mittelwerte, berechnet aus den relativen Häufigkeiten.

Abb. lo Prozentuale Anteile klonaler Stammzellen in der auf die Bestrahlung folgenden Mitose ohne (■), mit einer (□) sowie mit zwei und mehreren (▣) chromosomalen Deletionen pro Zelle und mit einer oder mehreren (●) "Zwei-Ereignis"-Aberrationen pro Zelle. Bestrahlt wurde mit 3oo rad in der frühen G_1-Phase. Eingetragen sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler der Mittelwerte, berechnet aus den relativen Häufigkeiten.

Abb. 11 Prozentuale Anteile klonaler Stammzellen mit der entsprechenden Bildung von Zellkolonien. Bestrahlt wurde mit 3oo rad in der frühen G_1-Phase. Es bedeuten: (o——) bestrahlte Zellen mit Makrokoloniebildung; (o·······) bestrahlte Zellen ohne Koloniebildung; (x———) bestrahlte Zellen mit Mikrokoloniebildung von 3o-49 Zellen/Kolonie; (⊚——) bestrahlte Zellen mit Mikrokoloniebildung von 1o-29 Zellen/Kolonie; (▫——) bestrahlte Zellen mit Mikrokoloniebildung von 2-9 Zellen/Kolonie; (●–·–·–) unbestrahlte Zellen mit Makrokoloniebildung und (●– – – –) unbestrahlte Zellen mit Mikrokoloniebildung. Eingetragen sind die Mittelwerte und der mittlere Fehler der Mittelwerte.

Abb. 12 Zusammenfassende Darstellung von mitotischen Zellen ohne Aberrationen (⊗) und der entsprechenden Anteile mitotischer, klonaler Stammzellen mit Makrokoloniebildung (⊙) in Abhängigkeit der verschiedenen Zeiten nach der Synchronisation. (r) ist der von KOEHLER et al. (1976) vorgeschlagene Schätzwert für das Verhältnis von Restitution zu induziertem Strahlenschaden (●).

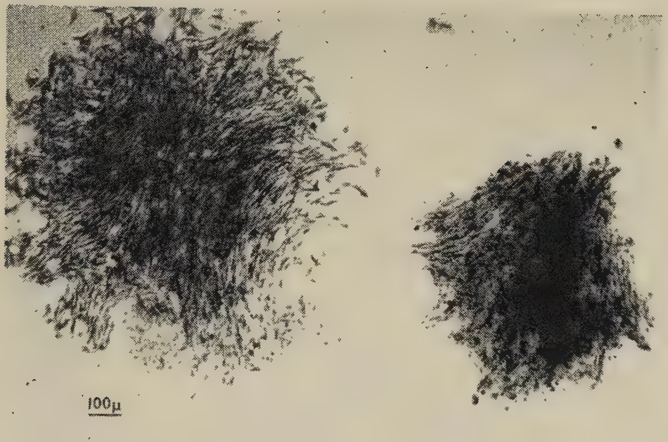


Abb.1

Abb.2

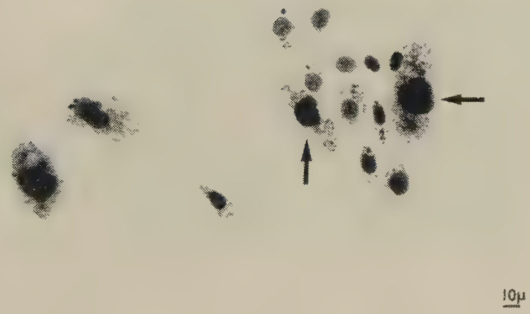
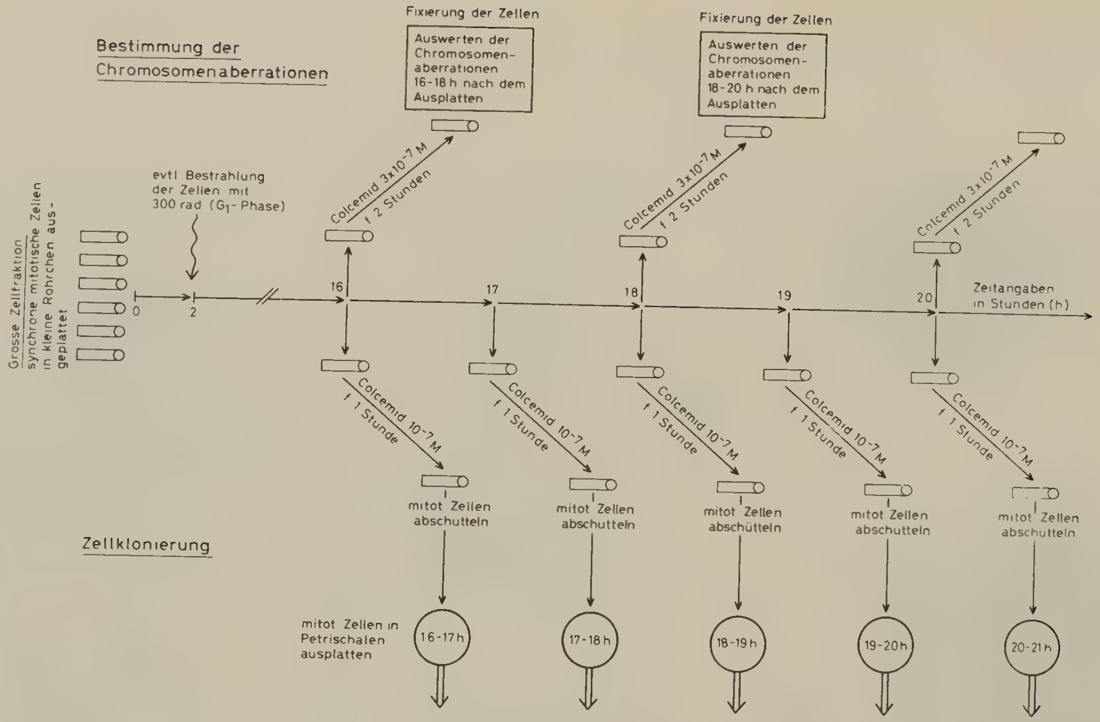


Abb.3



1 1/4 Stunden nach dem Setzen der Zellen in den Petrischalen werden unter dem Mikroskop die geteilten Tochterzellen beobachtet und gleichzeitig die Koordinaten notiert Nach 8 Tagen erfolgt die Fixierung und Auswertung der Klone

Abb. 4

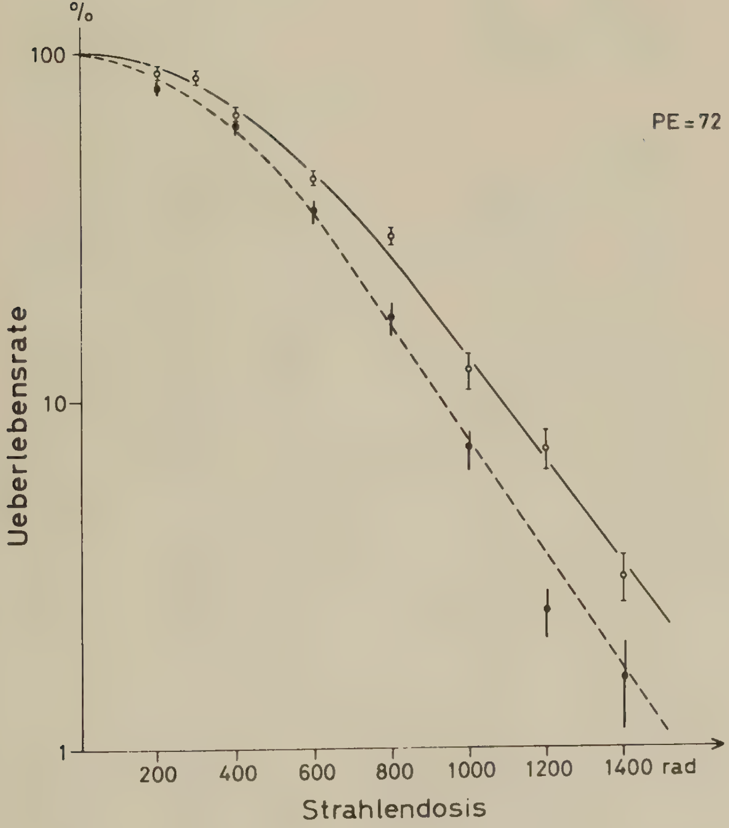

%
100
10
1
Ueberlebensrate
PE = 72
200
400
600
800
1000
1200
1400 rad
Strahlendosis

Abb. 5

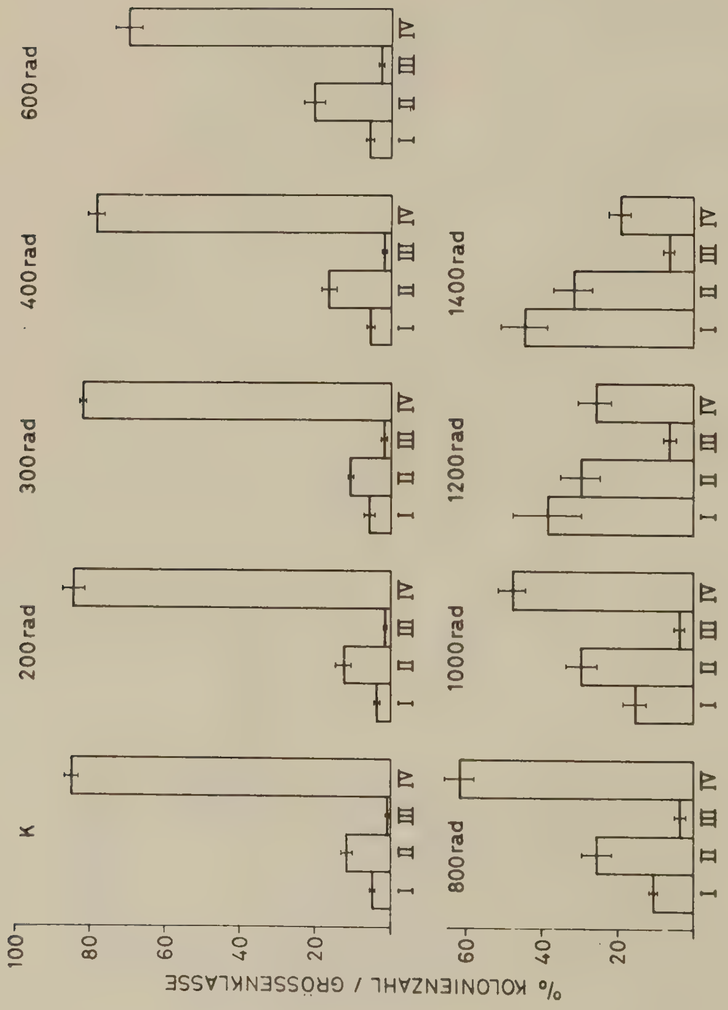

K
200 rad
300 rad
400 rad
600 rad
800 rad
1000 rad
1200 rad
1400 rad
I II III IV
100 80 60 40 20
60 40 20
% KOLONIENZAHL / GRÖSSENKLASSE

Abb.6

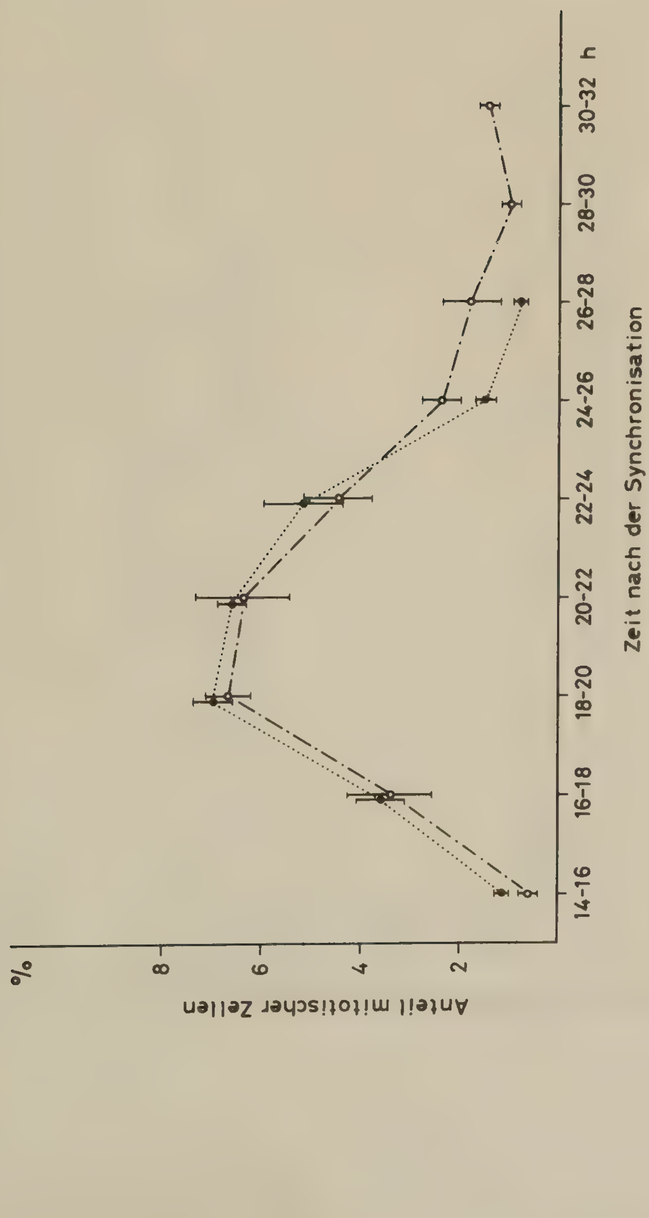

%
8
6
4
2
Anteil mitotischer Zellen
14-16
16-18
18-20
20-22
22-24
24-26
26-28
28-30
30-32
h
Zeit nach der Synchronisation

Abb.7

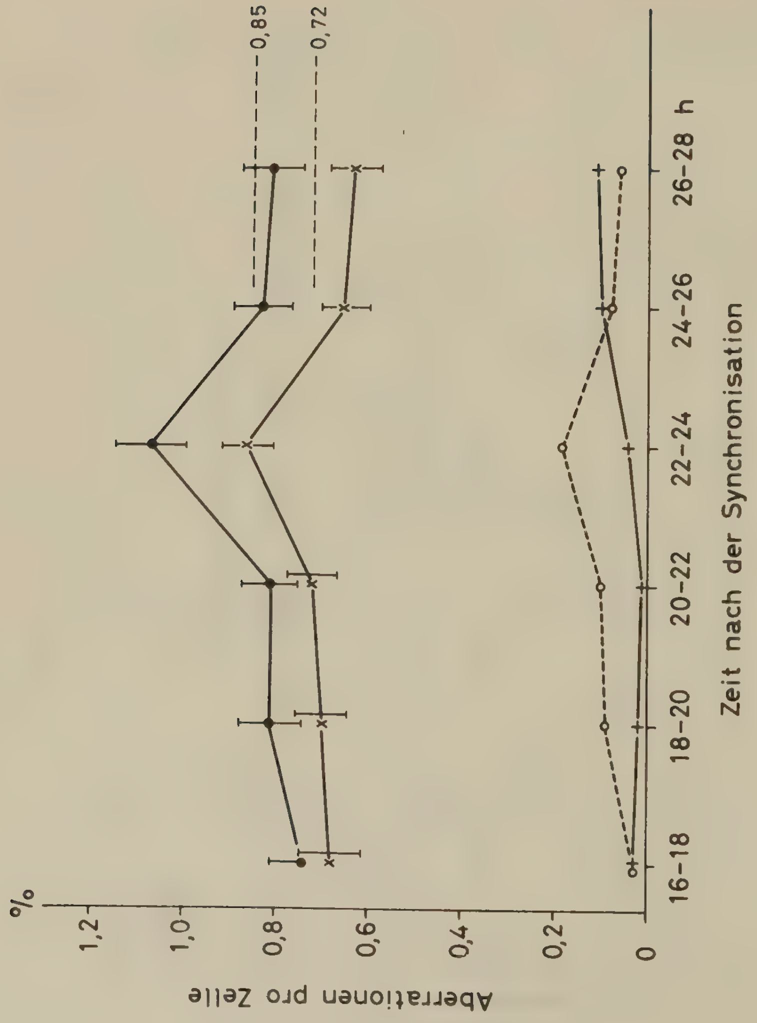

%
Aberrationen pro Zelle
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
0,85
0,72
16-18
18-20
20-22
22-24
24-26
26-28 h
Zeit nach der Synchronisation

Abb.8

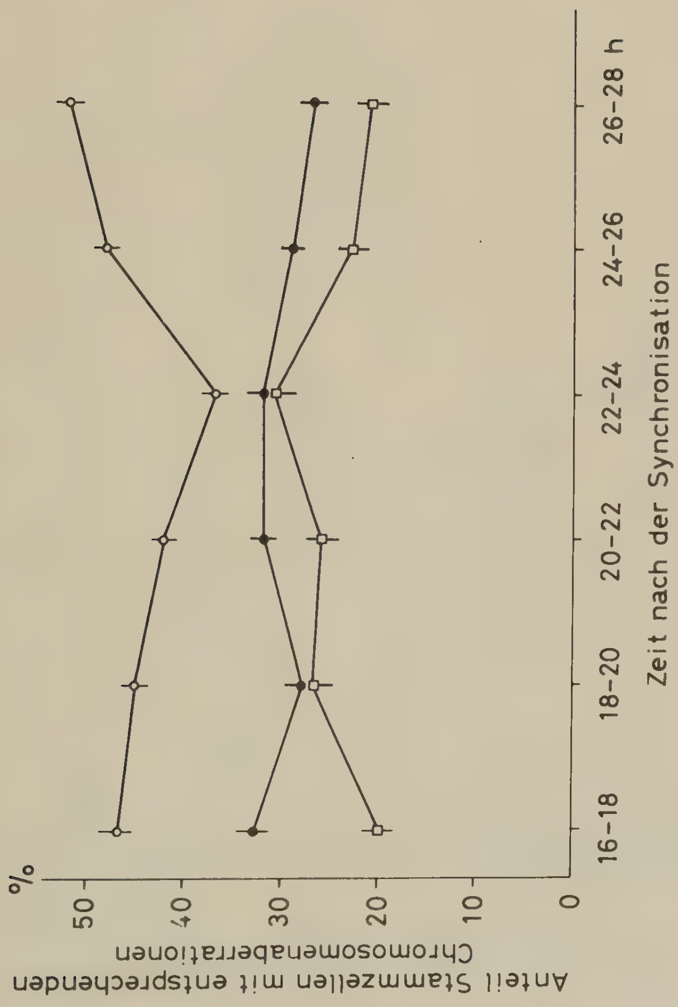

Anteil Stammzellen mit entsprechenden Chromosomenaberrationen
%
50
40
30
20
10
0
16–18
18–20
20–22
22–24
24–26
26–28 h
Zeit nach der Synchronisation

Abb.9

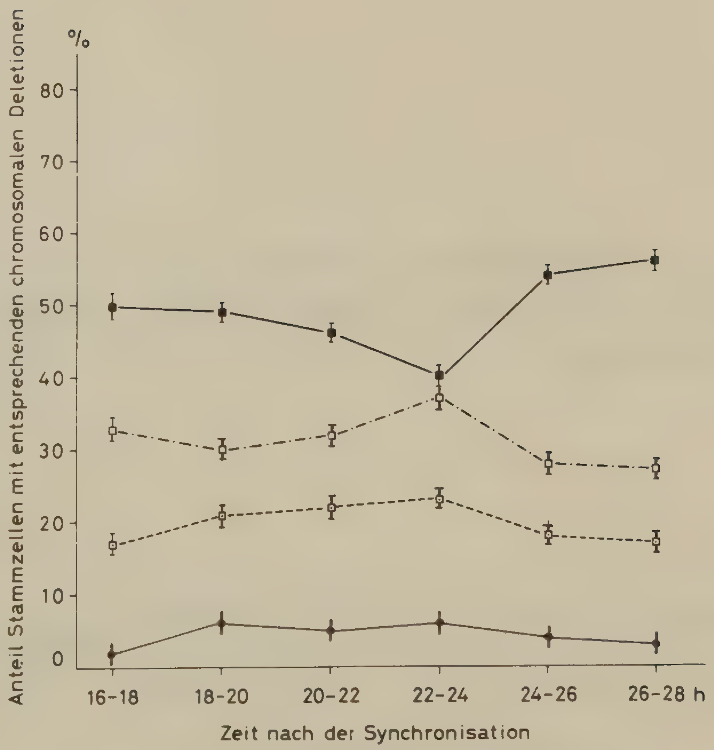

%
80
70
60
50
40
30
20
10
0
Anteil Stammzellen mit entsprechenden chromosomalen Deletionen
16-18
18-20
20-22
22-24
24-26
26-28 h
Zeit nach der Synchronisation

Abb.10

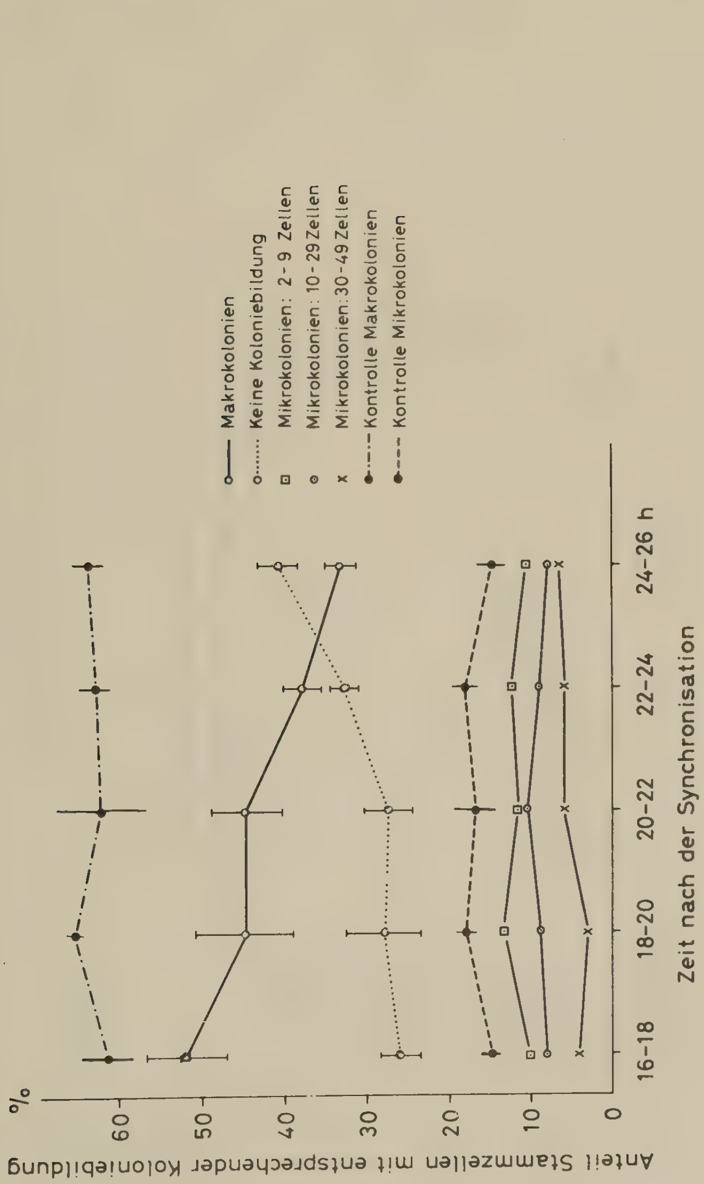

%
Anteil Stammzellen mit entsprechender Koloniebildung
60
50
40
30
20
10
0
16-18
18-20
20-22
22-24
24-26 h
Zeit nach der Synchronisation
Makrokolonien
Keine Koloniebildung
Mikrokolonien: 2-9 Zellen
Mikrokolonien: 10-29 Zellen
Mikrokolonien: 30-49 Zellen
Kontrolle Makrokolonien
Kontrolle Mikrokolonien

Abb.11

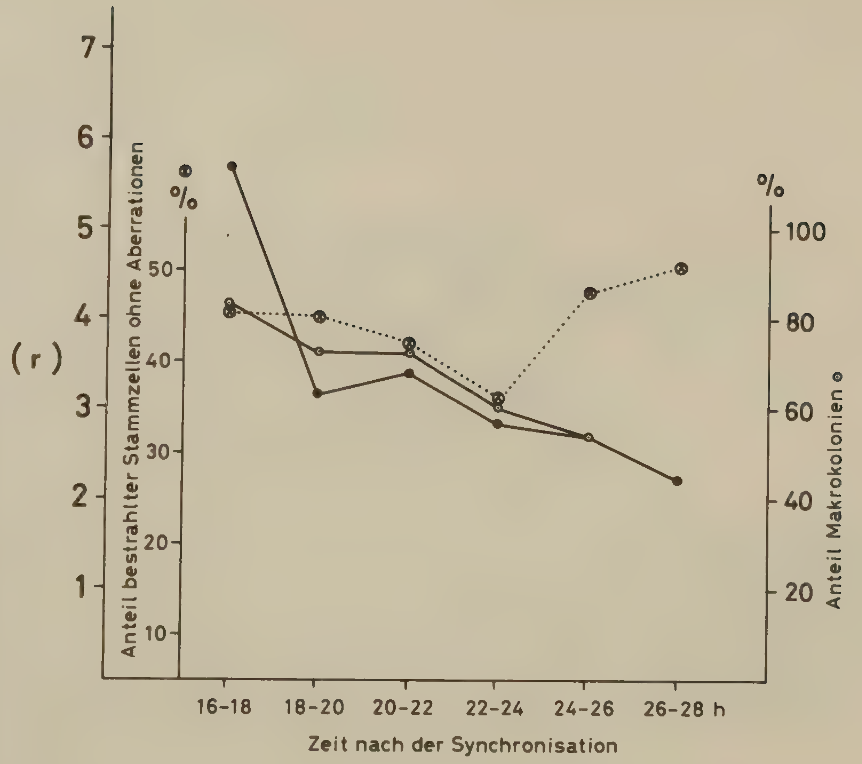

7
6
5
4
3
2
1
(r)
Anteil bestrahlter Stammzellen ohne Aberrationen
%
50
40
30
20
10
%
100
80
60
40
20
Anteil Makrokolonien
16-18
18-20
20-22
22-24
24-26
26-28 h
Zeit nach der Synchronisation

Abb.12

CURRICULUM VITAE

Tremp Josef, von Schänis (SG), geboren am 29. März 1946 in Näfels (GL). Nach dem Besuch der Primar- und Sekundarschule in Näfels trat ich 1962 in das Kantonale Lehrerseminar Rickenbach (SZ) ein, wo ich 1967 das Primarlehrerpatent erwarb. Nach halbjährigem Unterricht an der Primarschule in Glarus begann ich im Sommersemester 1968 an der Universität Zürich das Biologiestudium. Im Herbst 1973 bestand ich die Diplomprüfung als Naturwissenschafter mit Hauptfach Zoologie. Ich besuchte Vorlesungen, Kurse und Kolloquien der Dozenten R. Bachofen, J. Biegert, M. Birnstiel, H. Burla, P.S. Chen, C.D.K. Cook, C.H. Eugster, H. Fritz-Niggli, E. Hadorn, H. Hediger, H.R. Hohl, H. Hunsberger, E. Jungen-Hauschteck, H. Jungen, S. Kubik, E. Kubli, R. Nöthiger, H.R. Oswald, D. Rast, O. Rohweder, J. Schlittler, B. Stüssi, P. Tardent, H. Tobler, B.L. van der Waerden, H. Wanner, R. Wehner, CH. Weissmann und V. Ziswiler. Seit Februar 1974 arbeite ich als Assistent am Strahlenbiologischen Instiut der Universität Zürich. Die vorliegende Dissertation führte ich unter der Leitung von Frau Prof. Dr.H. Fritz-Niggli aus.